

Der Einfluss von DISC1 auf die neuronale Migration

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Fakultät für Biowissenschaften
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl. Biologe Falk Nitzsche
geboren am 07. November 1982 in Eisenach

1. Gutachter

Name: *Prof. Dr. Jürgen Bolz*
Institut: *Institut für Allgemeiner Zoologie und Tierphysiologie*
Straße: *Erbertstr. 1*
Ort: *Jena*

2. Gutachter

Name: *Prof. Dr. Andreas Gebert*
Institut: *Institut für Anatomie II*
Straße: *Teichgraben 7*
Ort: *Jena*

3. Gutachter

Name: *Prof. Dr. Hans Gert Bernstein*
Institut: *Klinik für Psychiatrie*
Straße: *Leipziger Str. 44*
Ort: *Magdeburg*

Datum der Disputation: *04.12.2018*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Neokortex	1
1.1.1	Die Embryonalentwicklung des Neokortex	2
1.2	Die Migration neuronaler Zellen im Neokortex	3
1.2.1	Die Migration kortikaler Interneurone	5
1.2.2	Die Bedeutung des Zytoskeletts bei der Migration von Interneuronen	6
1.3	Die Bedeutung kortikaler Interneurone	8
1.4	Schizophrenie	8
1.5	DISC1 als Risikogen für Schizophrenie	10
1.5.1	Der Einfluss von DISC1 auf die Gehirnentwicklung	14
1.5.2	Der Einfluss von DISC1 auf die neuronale Migration	14
1.5.3	Der Einfluss von DISC1 auf den neuronalen Reifungsprozess und die Reizweiterleitung	15
2	Zielstellung	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Chemikalien	18
3.2	Geräte und Materialien	20
3.3	Rezepturen, Puffer und Medien	21
3.4	Kits	23
3.5	Enzyme und dazugehörige Puffer	24
3.6	Antikörper	24
3.7	Oligonukleotide	24
3.8	Plasmide	25
3.9	Bakterienstämme	25
3.10	Zelllinien	25
3.11	Versuchstierstämme	25

3.12	Software.....	25
3.13	Versuchstiere	25
3.14	Molekularbiologische Methoden.....	26
3.14.1	Erzeugung eines GFP-markierten Plasmids mit einer vollständigen DISC1-Sequenz	26
3.14.2	Zellkulturen.....	29
3.14.3	Proteinextraktion aus Gewebe und Zellen	31
3.14.4	Messung der Proteinkonzentration.....	31
3.14.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	31
3.14.6	Western Blot	32
3.14.7	Immunpräzipitation.....	32
3.15	Herstellung primärer embryonaler Einzelzellen.....	33
3.16	Immunhisto- und Immunzytochemische Methoden.....	34
3.16.1	Perfusion adulter Mäuse	34
3.16.2	Fixieren, Einfrieren und Herstellen von Kryostatschnitten aus Hirngewebe.....	34
3.16.3	Immunhistochemie an Kryostatschnitten.....	34
3.16.4	Immunzytochemie an embryonalen Einzelzellen	35
3.16.5	Immunzytochemie an NIH3T3 Fibroblasten	36
4	Ergebnisse.....	38
4.1	Der Nachweis von exogenem DISC1 in NIH3T3 Fibroblasten	38
4.2	Die Expression von DISC1 im adulten Mäusegehirn.....	40
4.2.1	DISC1 Expression im adulten Hippocampus.....	40
4.2.2	DISC1-Expression im adulten Cerebellum.....	42
4.2.3	DISC1-Expression im Bulbus olfactorius.....	42
4.2.4	DISC1-Expression im adulten Kortex	43
4.2.5	Die Expression von DISC1 in Interneuronen des adulten Kortex	43
4.3	Die Expressionsmuster von DISC1 im sich entwickelnden Gehirn	45
4.3.1	Western-Blot-Analysen von verschiedenen Altersstadien der Maus.....	45
4.3.2	Immunhistochemische Analyse von DISC1 im sich entwickelnden Mausgehirn ...	46
4.4	Die Markierung von speziellen Fasertrakten im sich entwickelnden Gehirn durch den C-terminalbindenden DISC1-Antikörper	52
4.5	DISC1-Expression in kortikalen Interneuronen mit Ursprung in der MGE.....	55
5	Diskussion	59

5.1	Das Expressionsmuster von DISC1 spiegelt die publizierten Funktionen des Proteins während der kortikalen Entwicklung wider	60
5.2	DISC1-Expression in den Fasertrakten des embryonalen Gehirn	63
5.3	DISC1-Expression im Gehirn adulter Mäuse	63
5.3.1	DISC1-Expression im adulten Hippocampus	64
5.3.2	DISC1-Expression im adulten Bulbus olfactorius	65
5.3.3	DISC1-Expression im adulten Cerebellum	66
5.3.4	DISC1-Expression im adulten Neokortex	66
5.4	Unterschiedliche intrazelluläre Lokalisationen von DISC1 in embryonalen Interneuronen	67
6	Zusammenfassung	71
7	Summary	73
8	Referenzen	75
9	Eigenständigkeitserklärung	91
10	Danksagung	92
11	Anhang	93

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µM	mikromolar
AEP	Area Entopedunculare
A. bidest	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	Kälber-Serumalbumin
CC	Corpus callosum
CGE	caudale ganglionische Eminenz
DAPI	4',6-Diaminoo-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DISC1	Disrupted-in-Schizophrenia 1
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	verstärktes grünes Fluoreszenzprotein
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FBS	fötales Kälberserum
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAD67	Glutamatdecarboxylase 67
GBSS	Gey's balanced salt solution
GFP	grünes Fluoreszenzprotein
h	Stunde
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LGE	laterale ganglionische Eminenz
Lis1	Lissencephaly 1
M	Molar

MAP1A	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1A
min	Minuten
MGE	mediale ganglionische Eminenz
mRNA	Messenger-RNA
MZ	Marginalzone
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
P	Postnataltag
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RFP	rotes Fluoreszenzprotein
RNA	Ribonucleinsäure
POA	präoptisches Areal
RT	Raumtemperatur
SVZ	Subventrikularzone
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS-T	Tris balanced saline with Tween 20
Triton-X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
VZ	Ventrikularzone
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Der Neokortex

Das Telencephalon, welches bei Säugetieren den am höchsten ausdifferenzierten Teil des Zentralnervensystems darstellt, besitzt eine Rinde, den Neokortex oder kurz Kortex. Dieser dient als Integrationsstruktur jeglicher Reize, welche er verarbeitet und im Anschluss eine willkürliche Reaktion ermöglicht, um so mit der Umwelt zu interagieren und auf sie zu reagieren. Darüber hinaus befähigt die weit fortgeschrittene Ausbildung des Kortex beim Menschen zu logischem Denken, die Ausbildung eines Gedächtnisses, eine besondere Feinmotorik der Hände und die Ausbildung eines Bewusstseins.

Makroskopisch kann man den Kortex in zwei Hemisphären gliedern, welche von einer großen, von vorne nach hinten verlaufender Fissur getrennt werden. Diese Hemisphären wiederum lassen sich in Lappen aufteilen, welche ihre Bezeichnung aus der Lage zu den jeweiligen Schädelknochen erhalten: den Frontal-, Parietal-, Temporal- und Okzipitallappen. Zusätzlich gibt es noch zwei Bereiche des Kortex die durch die oben genannten Lappen verdeckt werden, den Gyrus cinguli und die Insel.

Mikroskopisch kann man den Neokortex als evolutionär jüngere Struktur vom zellulär anders aufgebauten und älteren Allokortex unterscheiden. Der Kortex des Telencephalons ist in sechs vertikale Zellschichten gliederbar, welche sich stark in ihrer jeweiligen Zelldichte und Zellmorphologie unterscheiden, teilweise aber auch fließend ineinander übergehen. Diese vertikalen Schichtmuster lassen sich horizontal in verschiedene Bereiche abgrenzen, welche sich auch funktionell voneinander unterscheiden, die sogenannten Brodmann Areale (Brodmann 1909). Die funktionelle Einheit besteht allerdings nicht nur in den horizontalen Brodmann Arealen: Hubel und Wiesel konnten zeigen, dass sich der Kortex in vertikale Kolumnen aufteilen lässt, in denen die Zellen auf analoge Reizbedingungen antworten (Hubel und Wiesel 1962). Im Neokortex sind zwei große Gruppen von Zelltypen vorherrschend. Den größten Anteil stellen die Gliazellen (hier hauptsächlich Oligodendro- und Astrozyten), welche eine Vielzahl an Funktionen ausführen. Sie dienen der Ernährung der Nervenzellen indem sie mit den Blutgefäßen in Verbindung stehen, hier sind sie unter anderem an der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Die Gliazellen steuern den Kalium- und Flüssigkeitshaushalt im Gehirn, regulieren die Neurotransmitterkonzentration im synaptischen Spalt und sind ein wichtiges Glied der Abfallentsorgung im Gehirn. Die zweite Gruppe von Zellen wird von den

Nervenzellen gebildet. Sie stellen ein Zehntel der Menge der Gliazellen und lassen sich grob in zwei Populationen einteilen: Pyramidenzellen, die auch als exzitatorische Projektionsneurone bezeichnet werden, und in inhibitorische Interneurone. Die Projektionsneurone bilden mit 85 % die Hauptmasse an Nervenzellen und stellen die Gesamtheit der kortikalen Efferenzen. Mit ihren Dendritenbäumen empfangen sie gleichzeitig den Großteil der kortikalen Afferenzen. Ihr wichtigster Neurotransmitter ist das Glutamat. Den weitaus kleineren Anteil an Neuronen bilden die Interneurone, die ihren Namen der Tatsache verdanken, dass ihre Axone in der Regel nicht den Kortex verlassen, die Zellen also intrakortikal zwischen den Projektionsneuronen liegen. Hierbei handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe von Nervenzellen (Kepecs und Fishell 2014). Ihr Neurotransmitter ist meist GABA, welches bei den nachgeschalteten Nervenzellen ein inhibitorisches postsynaptisches Potential erzeugt. Trotz der geringen Anzahl von Interneuronen im gesamten Kortex ist gerade das Wechselspiel zwischen der Erregung durch Projektionsneurone und der Hemmung durch Interneurone notwendig, damit funktionierende Schaltkreise und ein leistungsfähiges Gehirn ausgebildet werden können.

1.1.1 Die Embryonalentwicklung des Neokortex

Die Masse der Zellen des Kortex der Maus werden zwischen den Embryonaltagen E10,5 und E14,5 in der VZ geboren. Nach der Geburt wandern die Vorläuferzellen der exzitatorischen Projektionsneurone radial entlang von Gliazellen vom Ventrikel nach distal aus. Hierbei bestimmt der Zeitpunkt der Geburt die spätere Position innerhalb des sechsschichtigen Kortex. Zellen, die zuerst geboren wurden, bilden die Schichten V und VI, jüngere Zellen die Schichten II, III und IV, es findet also eine Entwicklung von innen nach außen statt (Rakic, 1971, 1974; McConnell, 1988). Die hemmenden Interneurone werden zwar auch in der VZ des basalen Telencephalons geboren, erreichen aber ihren Zielort im Kortex durch tangentielle Migration (De Carlos et al., 1996; Anderson et al., 2001; Marin und Rubenstein, 2001). In der weiteren neuronalen Entwicklung bilden die Nervenzellen an ihren Zielorten charakteristische Schaltkreise zwischen den einzelnen Schichten aus, welche essentiell für ein funktionierendes Gehirn sind. Es bestehen Verbindungen zwischen den Nervenzellen von Schicht II, III mit der Schicht V und zwischen den Schichten IV und VI (Garey und Powell, 1971; Lund und Mustari, 1977). Weiterhin gibt es auch Besonderheiten bei den Efferenzen und Afferenzen: die thalamischen Afferenzen erreichen den Kortex in der Schicht IV, die kortiko-thalamischen Efferenzen verlassen den Kortex allerdings aus der Schicht VI. Die verschiedenen kortikalen Areale stehen über Fasern der Schichten II und III

miteinander in Verbindung (Gilbert und Kelly, 1975; Bolz und Gilbert, 1986). Es ist also zwingend erforderlich, dass die Nervenzellen während der Gehirnentwicklung an ihre Zielorte migrieren, um dort ihre spezifischen Schaltkreise ausbilden zu können, denn nur so ist sichergestellt, dass es zur korrekten Ausbildung der entsprechenden Schaltkreise kommen kann. Ohne diese Schaltkreise wäre eine Verarbeitung von Umweltreizen und das Reagieren darauf nicht möglich (Gilbert und Wiesel, 1979; Bolz und Gilbert, 1986, 1989).

1.2 Die Migration neuronaler Zellen im Neokortex

Die beiden großen Gruppen von Neuronen im Neokortex, die exzitatorischen Projektionsneurone und inhibitorischen Interneurone, bilden die Grundlage für alle neuronalen Prozesse im Gehirn. Sie werden in besonderen Proliferationszonen gebildet und migrieren zu ihren Zielregionen. Dort angekommen findet eine endgültige Ausdifferenzierung und die Ausbildung neuronaler Netzwerke statt.

Die Projektionsneurone werden in der Proliferationszone des dorsalen Telencephalons geboren. Dabei durchlaufen die neuronalen Vorläuferzellen während ihres Zellzyklus ein festgelegtes oszillierendes Bewegungsmuster innerhalb der VZ. Während dieser Zellzyklen kommt es zu asymmetrischen Zellteilungen, bei denen sich Teile der geborenen Zellen in Neurone ausdifferenzieren und den Zyklus verlassen (Caviness und Takahashi 1995). Um ihren Bestimmungsort innerhalb des Kortex zu erreichen, wandern die Neurone entlang der Fasern der radialen Glia, bis sie durch Stopp-Signale, wie zum Beispiel Reelin, zum Halten gebracht werden und die radiale Migration verlassen (Nadarajah et al. 2001). Damit den Projektionsneuronen ihre Migration ermöglicht werden kann, ist das Vorhandensein der radialen Glia unerlässlich. Deren Somata befinden sich in der VZ und ist mit ihren Fortsätzen in der Basalmembran verankert (Kriegstein und Noctor 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden die Fortsätze der radialen Glia während dieser kritischen Phase der Gehirnentwicklung genauer untersucht.

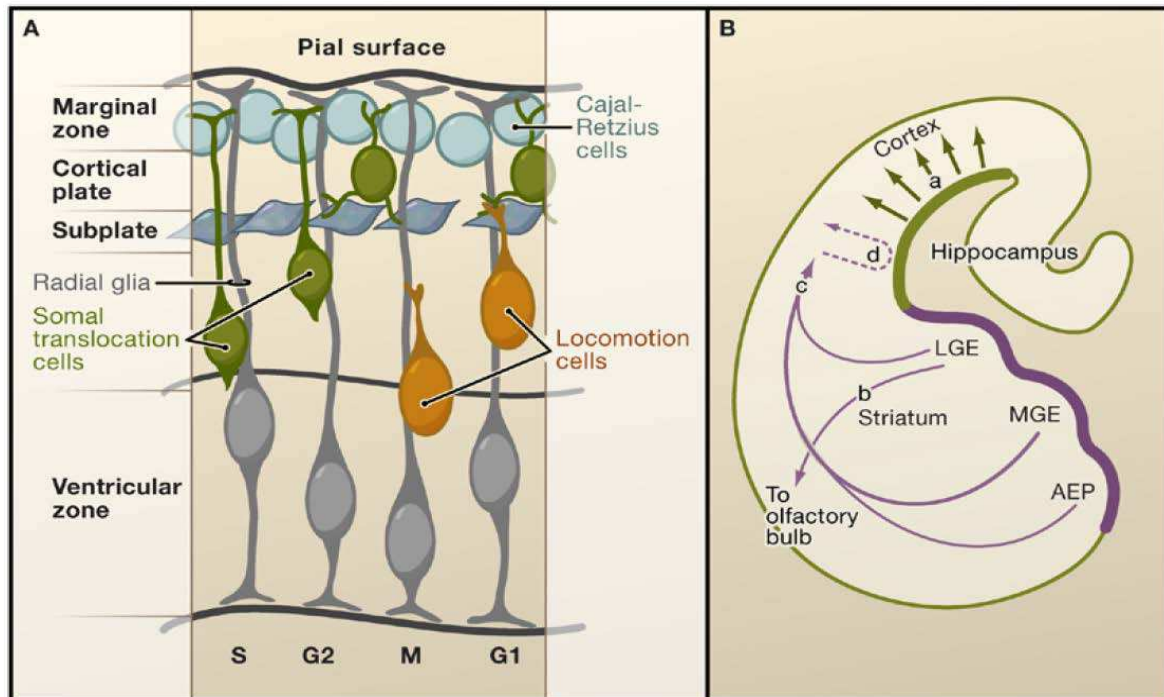


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Migration von Neuronen nach Ayala et al. 2007

(A) Entstehung und radiale Migration von Projektionsneuronen. Die Neurone werden in der VZ geboren und migrieren radial an den Fasern der Gliazellen in Richtung der Pia aus. Ihre Vorläuferzellen durchlaufen dabei während ihres Zellzyklus eine zyklische Translokation des Zellkerns. Hierbei befindet sich das Soma der Zelle während der M-Phase am Ventrikel und in den anderen Phasen (G1, G2 und S) im distalen Bereich der VZ. (B) Zeigt in einem schematischen, coronalen Hirnschnitt die Hauptmigrationsrouten von Neuronen im sich entwickelnden Kortex. In grün sind die radial wandernden Projektionsneurone dargestellt (a). In violett die GABAergen Interneurone dargestellt, welche in der LGE, MGE und dem präoptischen Areal (POA) gebildet werden. Sie wandern im Anschluss ihrer Entstehung in den Bulbus olfactorius (b) oder den Kortex (c und d). AEP: Area entopeduncularis entspricht dem POA, MGE: mediale ganglionische Eminenz, LGE: laterale ganglionische Eminenz.

Der Großteil der geborenen Interneurone und einige kortikale Oligodendrozyten verwenden nicht die radiale, sondern die tangentielle Migration, um ihren Bestimmungsort zu erreichen. Sie legen dabei weite Strecken von ihren Entstehungsorten innerhalb des basalen Telencephalons zurück. Die in der medialen ganglionischen Eminenz sowie dem präoptischen Areal gebildeten Interneurone wandern hauptsächlich in den Neokortex und Hippocampus.

Während die Interneurone der lateralen und caudalen ganglionischen Eminenz auch in den Bulbus olfactorius einziehen; der Migrationsstrom in den Bulbus olfactorius bleibt bis in das Erwachsenenalter erhalten (Marin und Rubenstein 2001, Kriegstein und Noctor 2004). Die tangentielle Migration unterscheidet sich nicht nur in Bezug auf ihren Start und Zielort, die Migrationsroute der Neurone ist hier auch abhängig vom Entwicklungsstadium: Früher geborene Interneurone tendieren eher dazu superfiziell zu migrieren, später geborene wandern zusätzlich auf tiefer gelegenen Migrationsrouten (Marin und Rubenstein 2001).

1.2.1 Die Migration kortikaler Interneurone

Da Interneurone bei der tangentialen Migration nicht über eine Leitstruktur, wie die radiale Glia, verfügen, sind für ihre Migration extrinsische Lenkungsmoleküle im sich entwickelnden Kortex entscheidend (Marin und Rubenstein 2003, Lehmann et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden Interneurone untersucht, welche der MGE entstammten. Die Migration dieser Neuronenpopulation wird hauptsächlich durch EphA/ Ephrin-A-Signale aktiviert. Beim Eintritt ins Striatum wirkt eine Ephrin-B-Interaktion repulsiv auf sie, so dass nur wenige Interneurone hier eingebaut werden (Zimmer et al. 2008, Zimmer et al. 2011, Lehmann et al. 2012, Rudolph et al. 2014, Steinecke et al. 2014).

Die Migration der kortikalen Interneurone wird neben den extrinsischen Lenkungsmolekülen auch durch intrinsische Faktoren maßgeblich beeinflusst. Die im basalen Telencephalon geborenen, postmitotischen Interneurone verfügen über eine Polarität, welche durch das Zytoskelett realisiert wird. Für diese Polarität nimmt das Zentrosom eine entscheidende Rolle ein, da es das wichtigste Mikrotubuli-organisierende Zentrum der Zelle ist. Von ihm gehen bei migrierenden Interneuronen in zwei Hauptrichtungen Mikrotubuli aus: Einmal in Richtung des Zellkerns, welcher den hinteren Zellpol bildet, und in die entgegengesetzte Richtung, wo es zur Ausbildung eines sogenannten Führungsfortsatzes kommt (Li und Gundersen 2008).

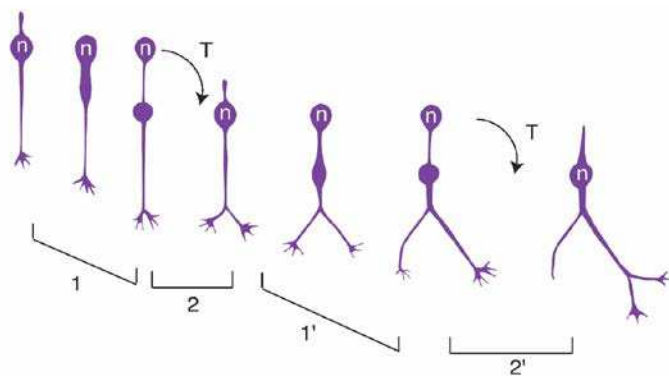


Abbildung 2 Schematische Darstellung des Migrationsmodus kortikaler Interneurone nach Métin et al. 2006

Während der Migration verzweigen Interneurone ihren Führungsfortsatz meist bifurkal (1, 1'). Das Wachstum der Fortsätze ist sehr dynamisch, trifft einer auf repulsive Lenkungsmoleküle wird er zurückgebildet und der Zellkern (n) in den verbliebenen Fortsatz verlagert. Dieser Kerntranslokation (T) geht eine Schwellung (1, 1') im Führungsfortsatz voraus, in welche der Kern einwandert (2, 2'). Diese Zyklen wiederholen sich im Anschluss (1', 2').

Dieser Führungsfortsatz ist bei den migrierenden Interneuronen ein dynamischer Prozess, welcher meist bifurkal verzweigt vorliegt und dessen Enden von der Struktur den Wachstumskegeln von Axonen ähneln (Rakic 1971, Bellion et al. 2005). Trifft eines der beiden Enden des Führungsfortsatzes auf repulsiv wirkende Lenkungsmoleküle, so wird dieses eingezogen und das Interneuron migriert in die Richtung des anderen Führungsfortsatzendes (Martini et al. 2009).

Bei der Migrationsbewegung kommt es zu einer Schwellung im Führungsfortsatz, unmittelbar vor dem Soma, in welche der Zellkern mit der Hilfe des Zytoskeletts hineinbewegt wird. Dieser Prozess führt zu einer saltatorischen Kerntranslokation, bei welcher am hinteren Ende der Zelle ein nachhängender Fortsatz entsteht. Dieser wird im Anschluss eingezogen, während am vorderen Fortsatz eine neue Bifurkation entsteht (Moya und Valdeolmillos 2004, Bellion et al. 2005, Metin et al. 2006).

1.2.2 Die Bedeutung des Zytoskeletts bei der Migration von Interneuronen

Die tangentielle Migration kortikaler Interneurone muss von deren Zytoskelett realisiert werden. Zur Ausbildung des Führungsfortsatzes und der Wachstumskegel-ähnlichen Struktur an dessen Spitze ist es nötig Membrananteile an den vorderen Zellpol zu transportieren: dieser Transport ist Mikrotubuli abhängig. In den ausgebildeten Filopodien kann nun ein F-Aktinnetzwerk etabliert werden (Dehmelt und Halpain 2004).

Wie die Neurone die Kerntranslokation realisieren wird zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch untersucht und verschiedene Theorien werden diskutiert. Bei Projektionsneuronen wird davon ausgegangen, dass das Zentrosom vor dem Kern in die entstandene Schwellung wandert und Mikrotubuli von ihm ausgehend eine Art Käfig um den Kern bilden (Schaar und McConnell 2005, Tsai und Gleeson 2005, Higginbotham und Gleeson 2007). Durch den Dynein-Motorkomplex wird im Anschluss der Kern entlang der Mikrotubuli in die Schwellung transportiert (McKenney et al. 2010).

Bei Interneuronen geht man davon aus, dass der Zellkern in die Schwellung des Führungsfortsatzes geschoben wird, verursacht durch F-Aktin und dem Aktin-assoziiertem Motorprotein Myosin II, welches hinter dem Kern akkumuliert vorliegt und den Kern durch Kontraktion nach vorne schiebt (Bellion et al. 2005, Schaar und McConnell 2005, Martini und Valdeolmillos 2010).

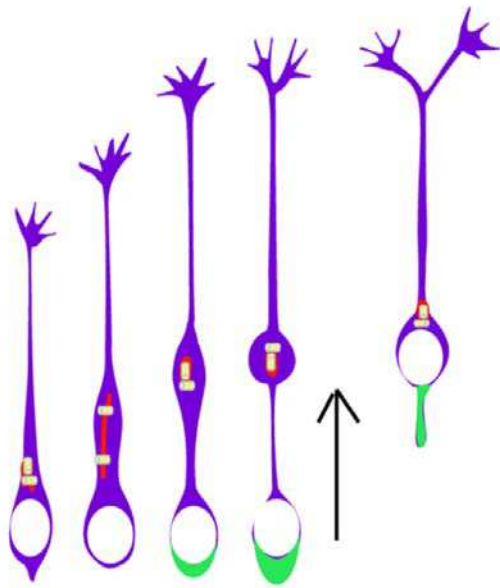


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Cytoskeletts migrierender Neurone nach Bellion et al. 2005

Vor der Translokation des Zellkerns (weiß) wird das Zentrosom (gelb) und der Golgi-Apparat (rot) in die Schwellung des verlängerten Führungsfortsatzes verlagert. Die Zentriolen des Zentrosoms teilen sich und der Golgi-Apparat wird verlängert, woran sich eine Akkumulation von Myosin II (grün) am hinteren Pol der Zelle anschließt. Durch eine Kontraktion des Myosin II wird der Zellkern in die Schwellung geschoben. Dieser Prozess lässt häufig einen nachhängenden Fortsatz mit Myosin II zurück.

Die neuronale Migration ist ein entscheidender Schritt der Ontogenese. Schon bei diversen psychischen Krankheiten ließ sich eine fehlerhafte Ausbildung der neuronalen Schaltkreise im Kortex nachweisen, welche auf Genmutationen, wie Lissencephalie-1 (Lis1), DAB1 oder Reelin, zurückgeführt wurden. Für Lis1 konnte bereits gezeigt werden, dass es mit dem Zytoskelett interagiert und für die nukleare Translokation bei Interneuronen nötig ist (Tsai et al. 2007, Huang et al. 2012).

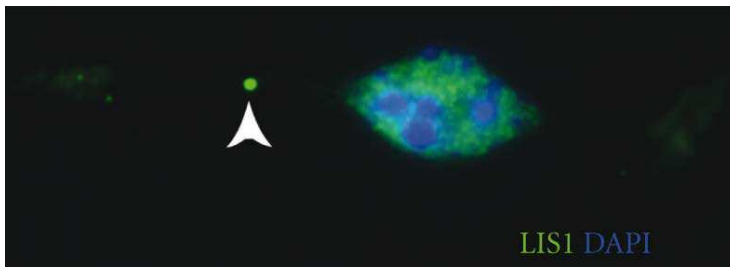


Abbildung 4 Isoliertes Interneuron einer Maus an Embryonaltag E14,5 nach Lehmann et al. 2012

Immunzytochemische Markierung von Lis1 (grün) am Zentrosom (weißer Pfeil) eines migrierenden Interneurons im Führungsfortsatz der Zelle vor der Translokation des Zellkerns (blau). Die Migrationsrichtung im Bild ist von rechts nach links.

Es ist bekannt, dass ein Interaktionspartner von Lis1 das Protein Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) ist. Dieses steht im Verdacht einen Einfluss auf die Migration von Projektionsneuronen zu haben. Die vorliegende Arbeit untersucht die Expression des Proteins DISC1 im Gehirn während der Ontogenese und auf den Migrationsrouten innerhalb des Kortex.

1.3 Die Bedeutung kortikaler Interneurone

Bei Interneuronen handelt es sich um die Zellen des Kortex, welche mit Abstand die höchste Diversität aufweisen. Lange Zeit wurden sie nicht unterteilt und man verstand sie mehr als ein Kontinuum von Neuronen, in welchem sich die Zellen in ihrer Gestalt, Verschaltung, Elektrophysiologie und der Expression von Marker-Genen unterschieden. Heute sieht man sie als eine sehr heterogene Gruppe von Nervenzellen, die man anhand ihrer Eigenschaften in rund 20 verschiedene Klassen unterteilt (DeFelipe et al. 2013, Kepecs und Fishell 2014).

Obwohl die Gruppe der Interneurone nur 20 % der Neurone des Gehirns bilden, sind sie entscheidend für die Synchronisation und Kontrolle der neuronalen Aktivität im Gehirn. So regulieren sie den synaptischen Eingang in Pyramidenzellen mittels dendritischer Inhibition und sind in der Lage die Ausgangssignale durch somatische Hemmung zu kontrollieren (Freund 2003). Gerade in der embryonalen und frühen postnatalen Ontogenese ist die Ausbildung dieser Schaltkreise essentiell für nötige Lern- und Gedächtnisprozesse (Hensch 2005). Ist diese notwendige Balance von Exzitation und Inhibition im Kortex gestört, wird das Auftreten von psychischen Erkrankungen, wie zum Beispiel Epilepsie, Schizophrenie, Autismus, Bipolarität und dem Tourett-Syndrom, begünstigt (Rubenstein und Merzenich 2003, Mohler et al. 2004, Kalanithi et al. 2005, Lewis et al. 2005, Konradi et al. 2011).

1.4 Schizophrenie

Unter dem Begriff Schizophrenie wird ein Spektrum von psychischen Erkrankungen zusammengefasst, welches etwa 1 % der Weltbevölkerung betrifft (Jablensky et al. 1992). Es gibt eindeutig genetische Faktoren, die zum Erkranken mit Schizophrenie beitragen. So steigt die Wahrscheinlichkeit an Schizophrenie zu erkranken mit dem Grad der Verwandtschaft zu einem Erkrankten, doch selbst bei eineiigen Zwillingen liegt sie nur bei 45 % (Gershon et al. 1988, Kendler und Diehl 1993). Dies zeigt, dass weitere Faktoren für den Ausbruch der

Krankheit verantwortlich sind. Als gesichert gilt, dass pränatale Infektionen der Mutter, als auch postnataler Stress des Neugeborenen das Entstehen von Schizophrenie begünstigen (Davison und Neale 1996, Falkai 2008). Neuere Studien legen auch die Vermutung nahe, dass Drogenkonsum im Jugendalter zu psychischen Erkrankungen, wie zum Beispiel Schizophrenie, beitragen kann. Die Symptome der Krankheit sind sehr variabel ausgeprägt. Die Patienten leiden unter anderem an Positivsymptomen, wie Wahnvorstellungen, anhaltenden Sinnestäuschungen bis zu Halluzinationen oder Sprech- und Denkstörungen, um nur einige zu nennen. Dazu werden Negativsymptome ausgebildet, wie der gesellschaftliche Rückzug, der bis zum Stupor und Mutismus führen kann und das Abflachen der Empfindsamkeit bis hin zur Apathie. Andere typische Negativsymptome von Schizophrenie-Patienten sind Defizite im Lernen und Gedächtnis. Der Teil der hier aufgezeigten Symptome zeigt, wie schwer diese psychische Erkrankung ist. Dies wird zusätzlich durch die enorme Suizidrate der Patienten, welche bei 20 – 50 % liegt, gestärkt (Tidemalm et al. 2008). Es ist mehr als dringend auf diesem Gebiet zu forschen, um das Leiden der Betroffenen so weit wie möglich zu reduzieren.

Das breite Spektrum an Symptomen, welche Schizophrenie-Patienten ausbilden, spiegelt sich auch in der Anzahl der Hypothesen über die Ursachen, die zu der Erkrankung führen, wider. Als weitestgehend anerkannt gilt die eingangs dargelegte Hypothese, dass sowohl genetische Voraussetzungen sowie das Vorhandensein von äußeren Faktoren zum Ausbruch der Krankheit benötigt werden.

Ein großer Teil der weiteren Hypothesen stellt die Neurotransmitter in den Mittelpunkt. Diese Annahmen basieren meist auf die Wirkung von Medikamenten bei Schizophrenie-Patienten. So gibt es Therapieansätze am dopamin- und glutamatergen System (Lang et al. 2007). Dem gegenüber stehen neue Studien, die dem GABAergen Netzwerk eine wichtige Bedeutung im Krankheitsbild der Schizophrenie einräumen (Lewis et al. 2005, Lewis et al. 2012). Diese Hypothese wird durch weitere Studien gestützt, welche zeigen konnten, dass es bei Schizophrenie-Patienten zu einer verringerten Expression des GABA-produzierenden Enzyms GAD67 sowie des interneuronenspezifischen Gens Parvalbumin im Gehirn kommt (Akbarian et al. 1995, Hashimoto et al. 2003). Darin könnte die Ursache einer gestörten γ -Oszillation liegen, welche Interneuronen vermittelt ist (Cardin et al. 2009, Sohal et al. 2009). Hierbei kommt es zu einer fehlerhaften Synchronisation der Pyramidenzellen im Gehirn, welche zu Defiziten in der Leistung des Kurzzeitgedächtnisses bei Schizophrenie-Patienten führt (Lewis et al. 2005, Uhlhaas und Singer 2010).

Der Ausbruch von Schizophrenie beim Patienten ereignet sich meistens im jungen Erwachsenenalter bzw. der späten Pubertät. Die Neuro-Entwicklungshypothese zur Entstehung von Schizophrenie geht allerdings davon aus, dass bereits im embryonalen und fötalen Stadium Störungen auftreten. Solche Effekte haben dann eine fehlerhafte Verschaltung von Neuronen und eine veränderte biochemische und physiologische Funktion dieser zur Folge (Raedler et al. 1998, Harrison 1999, Jaaro-Peled et al. 2009, Owen et al. 2011). Auch der häufig fehlerhaften Kommunikation zwischen unterschiedlichen Kortex-Arealen bei Schizophrenie-Patienten liegen Verschaltungsprobleme zugrunde, welche wahrscheinlich bereits in der Entwicklung ausgebildet wurden (Lewis et al. 2005, Daskalakis et al. 2007, Nakazawa et al. 2012, Marin 2012). So konnte auch gezeigt werden, dass es bei Erkrankten zu einer ektopischen Ansammlung kortikaler Interneurone in der weißen Substanz kommt, ein Hinweis auf Migrationsdefizite in der fötalen Entwicklung (Anderson et al. 1996, Eastwood und Harrison 2003, Joshi et al. 2012).

Die Menge der Hypothesen zeigt, dass es notwendig ist, die Ursachen von Schizophrenie übergreifender zu betrachten, und zwar über verschiedene Altersstadien und an verschiedenen Orten des Zentralnervensystems.

1.5 DISC1 als Risikogen für Schizophrenie

Das Gen DISC1 wurde erstmals im Stammbaum einer schottischen Familie entdeckt, deren Mitglieder in einem hohen Maß an schweren psychischen Erkrankungen litten, zu denen unter anderem Schizophrenie, Depressionen und Bipolarität zählten. Bei einem Teil der Familienmitglieder war durch eine balancierte chromosomale Translokation dieses Gen gestört, welches zu einer Verkürzung des Gens Disrupted-in-Schizophrenia 1 führte (Millar et al. 2000, Blackwood et al. 2001). DISC1 hat sich in den Folgejahren seiner Entdeckung als ein Risikogen für psychische Erkrankungen aus dem Spektrum der Schizophrenie etabliert (Chubb et al. 2008, Bradshaw und Porteous 2012, Murphy und Millar 2017). DISC1 besteht aus 13 Exons, diese kodieren für ein 854 Aminosäuren langes Protein (Millar et al. 2000, Millar et al. 2001). Northern Blots zeigten, dass seine Transkripte hauptsächlich im Gehirn, Herzen, Plazenta, Hoden und der Niere vorkommen (Ma et al. 2002). Alleine im Gewebe des menschlichen Gehirns konnten mehr als 40 verschieden gespleißte Transkripte identifiziert werden. Es ist allerdings noch nicht geklärt wie viele davon tatsächlich translatiert werden (Nakata et al. 2009).

Verschiedene Studien zeigten mittels Western Blot-Analysen, dass es mehrere Formen von DISC1 Proteinen gibt. Die meisten Autoren wiesen ein 100 – 105 kDa großes DISC1 Protein und ein oder mehrere Proteine mit der Größe von 75 kDa nach. Bei dem 100 kDa großen Protein wird davon ausgegangen, dass es sich um das Produkt aller 13 Exons handelt, man spricht dabei von der langen DISC1 Form oder L-Variante (Millar et al. 2001, Ishizuka et al. 2006). Die Zusammensetzung der 75 kDa großen Fraktion ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Es ist allerdings ziemlich sicher, dass es sich hier um DISC1 Fragmente handelt, die entweder den N-Terminus oder den C-Terminus des Proteins enthalten, abhängig von dem im Western Blot eingesetzten Antikörper (James et al. 2004). Das vollständige DISC1 Protein besteht aus einer N-terminalen Domäne (Aminosäuren 1–350) und einer C-terminalen Coiled-coil-Region (Superspiralisierung der Aminosäuren 350 – 854). Die genauere Verdrillung der C-terminalen Domäne ist noch in großen Teilen unbekannt und wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben (Brandon et al. 2005, Chubb et al. 2008, Leliveld et al. 2009). Als gesichert gelten nur die folgenden vier Verdrillungen: zwischen den Aminosäuren 347 – 393, 452 – 499, 603 – 680 und 805 – 828; diese sind wesentlich kürzer als bei typischen Coiled-coil-Proteinen, wie beispielsweise Myosin, Kinesin oder Keratin (Soares et al. 2011).

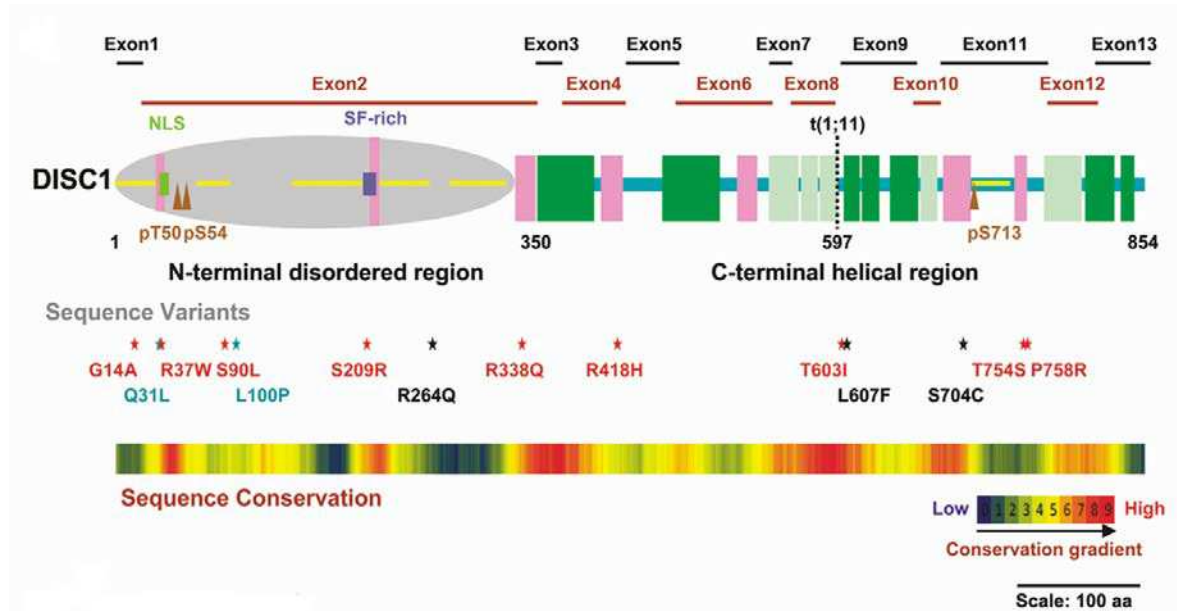


Abbildung 5 Schematische Darstellung der DISC1-Sekundärstruktur und ihre Varianten nach Soares et al. 2011

Dargestellt sind die 13 Exone, welche die gesamte Sequenz des DISC1-Proteins enthalten. Darunter ist die Proteinsequenz aufgeschlüsselt in: Die regulären α -Helices (rosa), die coiled-coil Helices (grün), undefinierte Helices, welche entweder reguläre oder coiled-coil sind (hellgrün) und eine ungeordnete Proteinregion (gelbe Linien). In der Sequenz wurden besondere Motive hervorgehoben: Eine Kernerkennungssequenz (NLS, grün), eine Serin-Phenylalanin-reiche Region (SF-rich, grau), Phosphorylierungsstellen (pT50, pS54, pS713, braune Dreiecke) und der Ort der chromosomalen Translokation t(1;11) an der Aminosäureposition 597. Mit Sternen sind die bekannten Mutationen von DISC1 angezeigt, wobei blaue sich auf Mutationen in der Maus beziehen, schwarze typische Mutationen und rote extrem seltene beim Menschen sind. Darunter

befindet sich eine „Heat Map“, die angibt, wie konserviert die jeweilige Region ist, hier steht rot für eine sehr hohe Konservierung und blau für eine sehr geringe. Daraus lässt sich erkennen, dass die N-terminale Region variabler als die C-terminale ist, obwohl sie die stark konservierten NLS- und SF-Regionen beinhaltet. Der Skalierungsbalken steht für 100 Aminosäuren innerhalb der Proteinsequenz.

Es konnte gezeigt werden, dass unter physiologischen Bedingungen die C-terminale Domäne die Fähigkeit zur Selbstverknüpfung zwischen verschiedenen DISC1 Proteinen besitzt, was zu Dimeren, Oktameren und Multimeren von DISC1 führt (Leliveld et al. 2008). Weitere Studien wiesen nach, dass diese Oligomere essentiell zur Interaktion mit anderen Proteinen sind (Leliveld et al. 2009). Oligomere von DISC1 Fragmenten können große intrazelluläre Aggregate ausbilden, welche in dieser Form ihre Bindungseigenschaften zu anderen Proteinen verlieren (Leliveld et al. 2008). Diese Aggregate könnten verschiedene Proteine rekrutieren, die sich dadurch innerhalb dieser nicht löslichen DISC1 Aggregate befinden. Die Proteinansammlungen werden im Anschluss durch das Zytoskelett zu Aggresomen transportiert, in denen sie proteolytisch abgebaut werden (Atkin und Kittler 2012). Es wird schon lange angenommen, dass Aggresomen und neuronale Erkrankungen in einem Zusammenhang zueinanderstehen (Tran und Miller 1999, Kopito 2000). Post-Mortem-Studien zeigten, dass sich in Gehirnen von Patienten mit chronischen psychischen Erkrankungen häufig DISC1 Aggregate befanden (Leliveld et al. 2008, Ottis et al. 2011, Atkin und Kittler 2012).

Die N-terminale Domäne des DISC1 Proteins ist zu einem Großteil durch wenig komplexe Aminosäuresequenz aufgebaut und wird nur durch zwei konservierte Motive unterbrochen (Ma et al. 2002, Taylor et al. 2003). Dieser Strukturtyp ist ein häufigeres Merkmal ungeordneter Proteinregionen (Romero et al. 2001). Die N-terminale Domäne ist größtenteils frei von sekundären Proteinstrukturen, wie β -Faltblättern oder Helices, und zeigt in seiner Sequenz eine größere Variabilität zwischen verschiedenen Organismen als die C-terminale Domäne (Taylor et al. 2003, Bord et al. 2006).

Proteine mit langen ungeordneten Sequenzen spielen eine immer größere Rolle in der Forschung (Bright et al. 2001, Dyson und Wright 2002, Liddington 2004). Das Fehlen von sekundären und tertiären Strukturen in diesen Proteinen ermöglicht ihnen eine schnelle Formveränderung, welche den Schlüssel zur Interaktion mit vielen verschiedenen Bindungspartnern darstellt. Dadurch besitzen diese Proteine einen großen Einfluss auf die Zellregulation (Fink 2005). Auch für DISC1, mit seiner variablen N-terminalen Domäne, trifft dies zu. Es konnten schon über 200 verschiedene Bindungspartner von DISC1 identifiziert werden (Morris et al. 2003, Millar et al. 2003, Ozeki et al. 2003, Camargo et al. 2007). Die Tatsache, dass ein Teil dieser Bindungspartner auch miteinander interagiert, legt den Schluss nahe, dass DISC1 an vielen bereits bekannten Signalwegen beteiligt ist. In diesen Wegen dient es als ein Gerüstprotein (scaffold protein) (Bradshaw et al. 2011).

1.5.1 Der Einfluss von DISC1 auf die Gehirnentwicklung

DISC1 spielt eine wichtige Rolle auf verschiedensten Gebieten der Entwicklung des Gehirns (Mao et al. 2009, Singh et al. 2010, Steinecke et al. 2012, Duan et al. 2007, Wang et al. 2011a). Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass DISC1 in der Maus sein Expressionsmaximum zwischen E14 und E15 hat. Dies korreliert mit der Neurogenese im sich entwickelnden Mausgehirn. Die gleiche Gruppe um Mao wies nach, dass DISC1 in neuronalen Vorläuferzellen innerhalb der Ventrikularzone (VZ) lokalisiert ist (Mao et al. 2009). Die Inhibition von DISC1 in diesem Stadium führt zu einer reduzierten Teilungsrate von neuronalen Vorläuferzellen und diese verlassen frühzeitig den Zellzyklus, um sich zu differenzieren. Die Gruppe konnte auch den verantwortlichen Mechanismus dahinter darstellen. Durch die verringerte Konzentration von DISC1 ist es nicht mehr in der Lage ausreichend GSK3 β zu binden. Dieses Protein seinerseits kann nun β -Catenin phosphorylieren, was zum Abbau von β -Catenin führt (Mao et al. 2009). Aufbauend auf dieser Studie wurden weitere Bindungspartner von DISC1 in diesem Signalweg gefunden: es interagiert mit DIXDC1 einem Protein, welches den Wnt-GSK3 β / β -Catenin-Signalweg reguliert (Singh et al. 2010). Diese Störungen in der Neurogenese konnten bei Mausstämmen, welche ein mutiertes DISC1 Gen besitzen, nachgewiesen werden (Kvajo et al. 2008, Shen et al. 2008, Lee et al. 2013).

1.5.2 Der Einfluss von DISC1 auf die neuronale Migration

Neben der korrekten Ausbildung von Neuronen ist ihre Migration für eine normale Kortextentwicklung entscheidend. DISC1 hat einen großen Einfluss auf die Migration von radial migrierenden Projektionsneuronen und auf die tangential auswandernden Interneurone (Kamiya et al. 2005, Duan et al. 2007, Kubo et al. 2010, Young-Pearse et al. 2010, Steinecke et al. 2012). Kamiya et al. zeigten, dass sowohl eine verminderte Expression von DISC1, als auch die Überexpression von verkürztem DISC1, zu einer fehlerhaften Ausbildung der Neurite migrierender Projektionsneurone führt (Kamiya et al. 2005). Die Gruppe konnte zeigen, dass DISC1 als Gerüstprotein für Dynein, Lis1 und NUDEL am Zentrosom dient. Der Motorkomplex rund um das Zentrosom ist für die korrekte Ausbildung des Axons und die Migration von Neuronen von entscheidender Bedeutung (Hatten 2002, Bielas et al. 2004). Wenn DISC1 nicht ausreichend zur Verfügung steht, können die kortikalen Vorläuferzellen nicht im ausreichenden Maß die kortikale Platte erreichen (Kamiya et al. 2005). Weiterhin führt eine DISC1 Inhibition im adulten Hippocampus zu einer Vergrößerung des Zellkörpers und dem vermehrten Ausbilden von Dendriten. Die dort geborenen und migrierenden Zellen

wandern bei einem DISC1-Knockdown über ihren Bestimmungsort hinaus und stoppen an falschen Zielorten (Duan et al. 2007). Eine mögliche Erklärung, warum im Kortex die Migration durch einen DISC1-Knockdown gehemmt ist, sie hingegen im Hippocampus dadurch im erhöhten Maße stattfindet, könnte der unterschiedliche Aufbau im Laufe der Entwicklung dieser beiden Gehirnstrukturen sein (Thomson et al. 2013).

Weitere Proteine sind notwendig, damit DISC1 am Zentrosom interagieren kann, zum Beispiel das Amyloid-Vorläuferprotein (APP). Es wurde gezeigt, dass ein Teil von DISC1 sich in der Membran an APP gebunden befindet, der Großteil allerdings in der Umgebung um das Zentrosom frei vorliegt. Ein Herunterregulieren von APP führt zu einer diffusen DISC1-Verteilung innerhalb der Zelle. Dieses kann so nur noch schwer seine Aufgaben am Zentrosom erfüllen, was zur Folge hat, dass die Zellen nicht mehr normal migrieren können (Young-Pearse et al. 2010).

DISC1 hat nicht nur Einfluss auf die sich entwickelnden kortikalen Projektionsneurone, ebenso die Migration der Interneurone wird durch DISC1 beeinflusst. Hier führt eine Reduzierung von DISC1 dazu, dass sich der Führungsfortsatz abnormal verlängert und wesentlich weniger verzweigt (Steinecke et al. 2012). Auf dieser Studie aufbauend konnte die Gruppe zeigen, dass DISC1 wichtig für die Bildung von F-Aktin und die Acetylierung der Mikrotubuli innerhalb der Interneurone ist. Beides scheint eine wichtige Rolle bei der Translokation des Zellkerns und damit der Migration der Interneurone zu spielen. Eine Reduktion von DISC1 hemmt diese entscheidend (Steinecke et al. 2014).

In Mausstämmen, die Punktmutationen im DISC1 Gen aufwiesen, konnte gezeigt werden, dass es die gleichen Proliferations-, Migrations- und Morphologiestörungen gab, wie in den in vivo Versuchen (Lee et al. 2011). Einige Gehirnteile solcher Versuchstiere ähneln im Aufbau denen von histopathologischen Gehirnschnitten beim Menschen (Ross et al. 2006).

1.5.3 Der Einfluss von DISC1 auf den neuronalen Reifungsprozess und die Reizweiterleitung

DISC1 hat nicht nur einen Einfluss auf die Proliferation und Migration von neuronalen Vorläuferzellen, wie oben gezeigt, sondern ist auch an der Reifung und dem Einbinden von Neuronen in bestehende Signalwege beteiligt. Es beeinflusst die Signaltransduktion von Nervenzellen (Thomson et al. 2013). Die Gruppe um Kvajo konnte zeigen, dass verkürztes DISC1 einen negativen Einfluss auf die Bildung von PDE4 in Nervenzellen des adulten Hippocampus hat, was zu einer erhöhten Produktion von cAMP führt (Kvajo et al. 2011). Die erhöhte Bildung von cAMP beeinflusst die Vernetzung der neugeborenen Neurone, da der cAMP-Signalweg eine entscheidende Rolle im Ephrin-System spielt, welches die axonale

Wegfindung der Nervenzellen steuert (Nicol et al. 2007). Die Aktivität von DISC1 in den adulten hippocampalen Neuronen ist vom Botenstoff GABA abhängig, ohne ihn kann DISC1 zum Beispiel nicht die Dendritenausbildung beeinflussen (Kim et al. 2012). Da die GABA-Antwort zwischen im adulten Hippocampus geborenen Neuronen und postnatalen Nervenzellen verschieden ist, wirkt DISC1 in verschiedenen Altersstadien unterschiedlich (Kim et al. 2012). Zwei weitere Gruppen konnten zeigen, dass DISC1 sowohl mit FEZ1 und NDEL1 interagiert, beides sind essentielle Proteine, um unter anderem für eine normale Ausbildung des Dendritenbaums zu sorgen (Duan et al. 2007, Kang et al. 2011).

DISC1 ist nicht nur an der Reifung und Vernetzung von Neuronen beteiligt, sondern ein wichtiger Faktor für die Reizweiterleitung. Für verschiedene Tierarten und den Menschen konnte gezeigt werden, dass DISC1 an den postsynaptischen Verdichtungen dendritischer Dornen lokalisiert ist und zwar in den verschiedensten Regionen des Gehirns (Kirkpatrick et al. 2006, Wang et al. 2011a, Ramsey et al. 2011, Paspalas et al. 2013). Hier beeinflusst es die Form und Dichte der Dornen, indem es unter anderem mit Kal-7 interagiert, was zu einer reduzierten Aktivität von RAC1 führt (Hayashi-Takagi et al. 2010). DISC1 besitzt eine Bedeutung an der Synapse: Mäuse mit verkürztem DISC1 besaßen präsynaptisch kleinere Vesikel (Kvajo et al. 2011), welche langsamer zum synaptischen Spalt transportiert wurden (Flores et al. 2011) und ihre Neurotransmitterfreisetzung war gestört (Maher und LoTurco 2012).

Die Expression von DISC1 ist von extrazellulären Mechanismen abhängig. Neuregulin-1 und -2 erhöhen die DISC1-Expression mittels des PI3/Akt-Signalwegs (Seshadri et al. 2010); werden die NMDA-Rezeptoren in Mäusen blockiert, senkt dies die Expression von DISC1 (Namba et al. 2011).

2 Zielstellung

Die vorliegende Dissertation hat als zentrales Ziel, die DISC1-Expression im sich entwickelnden Gehirn der Maus zeitlich und räumlich zu lokalisieren. DISC1, welches als ein Risikogen für Schizophrenie beim Menschen gilt und dessen Mutationen möglicherweise zu Schizophrenie, Depressionen, bipolaren Störungen und Autismus führen, scheint einen wesentlichen Faktor für die richtige Entwicklung des Gehirns darzustellen. Eine Beschreibung seines Expressionsmusters innerhalb des Zentralnervensystems ist ein wichtiger Schritt, die genaue Funktion von DISC1 in der Entwicklung des ZNS zu entschlüsseln.

Ein weiteres Ziel besteht darin, die Funktion von DISC1 innerhalb GABAerger Interneurone, einer wichtigen Zellpopulation des Zentralnervensystems, genauer herauszuarbeiten. Diese Neurone stellen einen wichtigen Faktor bei der Entstehung psychischer Erkrankungen, wie Schizophrenie und Autismus dar. Ihre inhibitorische Aktivität ist notwendig, um eine Balance zu den exzitatorischen Projektionsneuronen herzustellen, welche unerlässlich für korrekt funktionierende neuronale Netzwerke ist.

Um diese Ziele zu erreichen sollen folgende Schritte durchgeführt werden:

1. DISC1 wird in Zellkulturen überexprimiert und mit Antikörpern, welche gegen unterschiedliche Epitope des DISC1-Proteins gerichtet sind, nachgewiesen.
2. Die Expression von DISC1 in ausgewählten Strukturen des adulten Gehirns untersucht.
3. Die Expressionsmuster von DISC1 werden mittels Immunhistochemie und Western Blots in verschiedenen Altersstadien vom Embryonaltag E12 bis zum adulten Organismus analysiert.
4. Es wird untersucht, ob verschiedene Isoformen des DISC1-Proteins unterschiedlich verteilt im Kortex vorliegen, und hier im Besonderen wie DISC1 in den Axonen verteilt ist.
5. Die Verteilung von DISC1 in tangential migrierenden Interneuronen im Bezug zu deren Zytoskelett wird dargestellt.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

<i>Agarose</i>	Roth
<i>Ampillicin</i>	Gibco
<i>B27 Supplement</i>	Gibco
<i>BSA</i>	Serva
<i>Calciumchlorid (CaCl₂)</i>	Sigma-Aldrich
<i>Chloralhydrat</i>	Sigma-Aldrich
<i>Chloroform</i>	Merck
<i>DAB (3,3'-Diaminobenzidin)</i>	Roth
<i>DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)</i>	Sigma-Aldrich
<i>DEPC (Diethylpyrocarbonat)</i>	Sigma-Aldrich
<i>DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)</i>	Gibco
<i>DMSO (Dimethylsulfoxid)</i>	Sigma-Aldrich
<i>DNA-Standard</i>	Fermentas
<i>DNA-Ladepuffer</i>	Fermentas
<i>dNTPs</i>	Amersham
<i>EDTA</i>	Sigma-Aldrich
<i>Esel-Normalserum</i>	Jackson Immuno Research
<i>Ethanol</i>	Merck
<i>Essigsäure</i>	Roth
<i>Fötales Kälberserum (FBS)</i>	Gibco
<i>Geneticin</i>	Invitrogen
<i>D(+)-Glukose</i>	Merck
<i>L-Glutamin</i>	Merck
<i>Glycerol</i>	Sigma-Aldrich
<i>Glycin</i>	Roth
<i>HBSS (Hank's Balanced Solution)</i>	Gibco
<i>Hefeextrakt</i>	Roth
<i>HEPES</i>	Roth

<i>Isopropylalkohol</i>	Sigma-Aldrich
<i>Kaliumchlorid (KCl)</i>	Merck
<i>Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)</i>	Merck
<i>Laminin</i>	Sigma-Aldrich
<i>Lipofectamin™2000</i>	Invitrogen
<i>Magnesium-Dichlorid-Hexahydrat (MgCl₂ x 6H₂O)</i>	Merck
<i>Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO₄ x 7H₂O)</i>	Merck
<i>Methylcellulose</i>	Sigma-Aldrich
<i>MEM (Minimum Essential Medium)</i>	Gibco
<i>Mowiol</i>	Hoechst
<i>N2 Supplement</i>	Gibco
<i>Natriumchlorid (NaCl)</i>	Roth
<i>Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)</i>	Merck
<i>Natriumhydroxid (NaOH)</i>	Roth
<i>Natriumphosphat (NaH₂PO₄)</i>	Roth
<i>Neurobasalmedium</i>	Gibco
<i>Opti-MEM</i>	Invitrogen
<i>Paraformaldehyd [PFA, (CH₂O)_n]</i>	Merck
<i>Penicillin/Streptomycin</i>	Gibco
<i>Phalloidin</i>	Biotium
<i>Poly-L-Lysin</i>	Sigma-Aldrich
<i>n Propylgallat</i>	Sigma-Aldrich
<i>Proteasestop</i>	Roche
<i>Salpetersäure (HNO₃)</i>	Roth
<i>Salzsäure</i>	Roth
<i>Sucrose</i>	Sigma-Aldrich
<i>Tissue Taq</i>	Jung
<i>Tris</i>	Sigma-Aldrich
<i>Triton X100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)</i>	Roth
<i>Trizol</i>	Invitrogen
<i>Trypsin</i>	Sigma-Aldrich
<i>Trypton</i>	Roth
<i>Tween20 (Polysorbat 20)</i>	Sigma-Aldrich
<i>Ziegen-Normalserum</i>	Gibco

3.2 Geräte und Materialien

<i>2-Photonen konfokales Laser-Scanning Mikroskop LSM-510</i>	Zeiss
<i>Agarosegeldokumentation</i>	MWG Biotech
<i>Axioskop S-100</i>	Zeiss
<i>Brutschrank "HERA cell"</i>	Heraeus
<i>Deckgläser</i>	Menzel Gläser
<i>Gelelektrophoresevorrichtung</i>	Gibco
<i>Heizblock</i>	Eppendorf
<i>Hot-bead-Sterilisator</i>	Fine science tools
<i>Injektionsspritzen</i>	Braun
<i>Kryostat</i>	Leica
<i>Laminarbox "HERA safe"</i>	Heraeus
<i>Maschennetz</i>	Schütt
<i>MS2 Minischüttler</i>	Schütt Labortechnik
<i>Nanophotometer</i>	Implen
<i>Nitrocellulose-Membran</i>	Schleich und Schuell
<i>NuPAGE Gel</i>	Invitrogen
<i>Pipettensätze</i>	Brand/Gilson
<i>Petripermembranen</i>	Satorius
<i>Petrischalen</i>	Nunc
<i>pH-Meter</i>	Knick
<i>Präparierbesteck</i>	Roth
<i>Reaktionsgefäße</i>	Eppendorf
<i>Schüttler</i>	Edmund Bühler
<i>SPOT Kamera</i>	Visitron Systems
<i>Sterilfilter 520 A</i>	Schleicher & Schuell
<i>Stereomikroskop "SV6"</i>	Zeiss
<i>Thermocycler</i>	Eppendorf
<i>Thomakammer</i>	Assistent
<i>Whatmanfilterpapier</i>	Sigma-Aldrich
<i>XCell-Surelock Mini-Cell</i>	Thermo Fisher
<i>Zentrifuge 5804R und 5415C</i>	Eppendorf

3.3 Rezepturen, Puffer und Medien

Alle Lösungen wurden bei 4 °C gelagert, wenn nicht anders vom Hersteller vorgeschrieben. Nicht sterile Lösungen wurden mittels Sterilfilter (Porengröße 0,2µm) filtriert.

10x PBS („Phosphate Buffered Saline“): Aus einer Lösung von 120 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 14,7 mM KH₂PO₄ in 1 l Aqua bidest. wurde der pH-Wert bestimmt und mittels Zugabe von 0,1 M NaOH bzw. 0,1 M HCl auf 7,4 eingestellt und autoklaviert. 1x PBS wurde durch eine 1:10 Verdünnung mit A. bidest. hergestellt.

10x TBS-T: 24,23 g Tris, 87,66 g NaCl, 10 ml Tween20 auf einen Liter auffüllen mit Aqua bidest. 1x TBS-T wurde durch eine 1:10 Verdünnung mit A. bidest. hergestellt. Als Blockierungslösung in Western Blot-Versuchen wurde 1x TBS-T mit 5 % Milchpulver versetzt.

1x Krebspuffer: In einer Lösung von 126 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,2 mM NaH₂PO₄, 1,2 mM MgCl₂ x 6H₂O, 2,1 mM CaCl₂ in A. bidest. wird der pH-Wert auf 7,4 durch Zugabe von NaOH oder HCl eingestellt.

10%iges Chloralhydrat: 5 g Chloralhydrat wurde in 50 ml PBS gelöst und bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

65%ige Glucose-Stammlösung: 32,5 g D-Glukose wurden in 50 ml A. bidest. gelöst und bei 20 °C gelagert.

Blotting-Puffer: 3,028 g Tris, 14,413 g Glycin, 200 ml Methanol, 200 mg SDS mit Aqua bidest. auf einen Liter auffüllen. Der pH-Wert liegt dann zwischen 8,2 und 8,4 und muss nicht nachträglich mit HCl eingestellt werden.

DAB-Puffer: 4,5 ml Tris-HCl, 10 µl H₂O₂, 0,5 ml DAB. Der Puffer wurde vor jedem Versuch neu angesetzt. Das nötige DAB wurde dunkel bei -20 °C gelagert, die anderen Komponenten bei 4 °C.

DEPC-Wasser: 1 ml DEPC wurde in einem 1 l A. bidest. gelöst.

GBSS: Zur Herstellung von GBSS wurden 1,53 mM CaCl_2 , 3,66 mM KCl, 0,22 mM KH_2PO_4 , 1,03 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,28 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 137,93 mM NaCl, 2,70 mM NaHCO_3 , 0,84 mM Na_2HPO_4 und 5,56 mM Glukose in A. bidest. gelöst.

Laminin und Poly-L-Lysin in GBSS: Zum Beschichten der Deckgläschen wurde ein Gemisch von Laminin und Poly-L-Lysin in GBSS verwendet. Hierzu wurden jeweils 19,5 µg/ml Laminin und 5 µg/ml Poly-L-Lysin in GBSS gelöst.

LB Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl wurden mit 1 l A. bidest. versetzt. Um LBamp Medium zu erzeugen wurde nach dem Autoklavieren des Mediums 150 µl/ml Ampillicin zugegeben. Um LBamp-Platten zu erzeugen wurden 15 g Agar auf einen Liter Medium zugegeben.

Lysepuffer: 0,8766 g NaCl, 1 ml TritonX-100, 0,6055 g Tris wurden in 100 ml Aqua bidest. gelöst und der pH-Wert mit HCl auf 7,4 eingestellt. Pro 10 ml Lysepuffer wurde eine Tablette Proteasestop gegeben.

Medium für Fibroblastenzellen: Zu 90 ml DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) wurden 10 ml fötales Kälberserum und 1 ml Penicillin/Streptomycin gegeben.

Medium für kortikale Einzelzellen: Zu 90 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) wurden 150 µl 65%ige D-Glukose, 1 ml L-Glutamin, 1ml Penicillin/Streptomycin und 10 ml fötales Kälberserum hinzugefügt.

MOPS-Puffer: 50 mM MOPS, 50 mM Tris Base, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA, pH 7,7 in DEPC-Wasser gelöst.

Mowiol Einbettmedium: 25 % Mowiol wurde über 12 h unter Rühren in PBS gelöst. Im Anschluss daran wurden 50 % Glycerol zugegeben und erneut über Nacht gerührt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte auf 8,0 bis 8,5. Anschließend wurde 0,02 % Thimerosal zugegeben und die Lösung auf 50 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurden 17,5 % n-Propylgallat unter Rühren gelöst. Das Mowiol wurde bei 4000 U/min für 15 min zentrifugiert und bei -20 °C gelagert.

Neurobasalmedium für Einzelzellkulturen: In 47 ml Neurobasalmedium wurden 1 ml B 27 Supplement, 0,5 ml 65%ige D-Glukose, 0,5 ml Penicillin/Streptomycin und 0,5 ml L-Glutamin gelöst und bei 4 °C gelagert.

0,25%iges Trypsin: Eine 2,5%ige Trypsinlösung wurde 10-fach mit PBS verdünnt.

4 % PFA/PBS: Unter ständigem Rühren wurden 4 % Paraformaldehyd in PBS bei 58 °C gelöst. Nach Abkühlen auf RT wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 20 °C.

Präpariermedium: 0,99 g D-Glukose und 1,05 g NaHCO₃ wurden vor der Präparation primären Hirngewebes in 1x Krebspuffer gelöst und sterilfiltriert.

10 %ige und 30%ige Sucroslösung: 10 % bzw. 30 % Sucrose wurden in 1x PBS gelöst und bei 4 °C gelagert.

TAE-Puffer: Eine Lösung aus 40 mM Tris, 20 mM Essigsäure und 1mM EDTA wurden als Laufpuffer für die Gelelektrophorese verwendet.

SOC-Medium: 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 0,186 g KCl, 0,952 g MgCl₂, 1,204 g MgSO₄, 3,603 g Glucose auf einen Liter auffüllen mittels A. bidest.

3.4 Kits

MicroBC Assay: Protein Quantitation Kit

Uptima

Vectastain ABC Kit

Vector

Catch and Release System

Millipore

NucleoSpin Isolation of high-copy plasmid DNA from E. coli

Macherey-Nagel

3.5 Enzyme und dazugehörige Puffer

<i>HindIII + Puffer</i>	Fermentas
<i>XhoI + Puffer</i>	Fermentas
<i>XbaI + Puffer</i>	Fermentas
<i>Hot Start Taq DNA Polymerase + Puffer</i>	Qiagen
<i>SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) + Puffer</i>	Fermentas

3.6 Antikörper

<i>Esel anti Ziege DyLight488 1:500</i>	Jackson Immuno Research
<i>Esel anti Ziege Cy3 1:1000</i>	Jackson Immuno Research
<i>Esel anti Kaninchen Cy3 1:1000</i>	Jackson Immuno Research
<i>Kaninchen anti GFP 1:1000</i>	Invitrogen
<i>Kaninchen anti DISC1 1:100</i>	Invitrogen
<i>Kaninchen anti Lis1 1:50</i>	Santa Cruz
<i>Kaninchen anti Ziege biotinyliert 1:400</i>	Vector
<i>Maus anti Aktin 1:200</i>	Hybridoma Bank
<i>Maus anti E7-S-β-Tubulin 1:100</i>	Hybridoma Bank
<i>Maus anti TAG-1 1:100</i>	Hybridoma Bank
<i>Pferd anti Maus biotinyliert 1:400</i>	Vector
<i>Ziege anti Kaninchen Cy3 1:2000</i>	Jackson Immuno Research
<i>Ziege anti Kaninchen biotinyliert 1:400</i>	Vector
<i>Ziege anti DISC1 1:50</i>	Santa Cruz
<i>Ziege anti GFP 1:400</i>	Rockland

3.7 Oligonukleotide

<i>For 5' CTCGAGCTATGCAGGGCGGGGGTCCCCG 3'</i>	Fermentas
<i>Rev 5' TCTAGATCAGGCCTCGGTTTCCTGAGCACCA 3'</i>	Fermentas

3.8 Plasmide

<i>pCax mit der gesamten Sequenz von DISC1</i>	Geschenk von Dr. Sawa
<i>pEGFP-C1</i>	Clontech
<i>pmRFP-C1</i>	Clontech

3.9 Bakterienstämme

<i>E. coli DH10B</i>	Invitrogen
----------------------	------------

3.10 Zelllinien

<i>NIH3T3</i>	Sigma-Aldrich
---------------	---------------

3.11 Versuchstierstämme

<i>C57BL/6J</i>	Jackson Laboratory
<i>NOR</i>	Jackson Laboratory

3.12 Software

Für die statistische Auswertung und die Erstellung von Graphen wurde Microsoft Office Excel 2016 verwendet. Die Immunmarkierungen wurden mittels Zen 2011 Software (Zeiss) aufgezeichnet und mit ImageJ ausgewertet. Zur Erstellung der Abbildungen wurde Photoshop (Adobe) verwendet. Die Primersequenzen wurden mittels Blast-Tool von NCBI erstellt.

3.13 Versuchstiere

Alle Versuche an Tieren erfolgten nach den gesetzlichen Vorschriften und Verordnungen des Freistaates Thüringen, den Regularien der Universität Jena und Richtlinien des Instituts für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie.

In der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse der Stämme C57BL/6J und NOR verwendet. Diese wurden in einem klimatisierten Raum mit einem 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Damit eine exakte Altersbestimmung der pränatalen Tiere gewährleistet war, wurden die

Mäuse von 15.00 Uhr bis 7.00 Uhr des folgenden Tages verpaart, welcher als Embryonaltag E1 geführt wurde. Eine vorliegende Trächtigkeit wurde durch regelmäßiges Wiegen ermittelt. Diese lag höchstwahrscheinlich vor, wenn die Muttertiere z.B. am Embryonaltag E14 eine Gewichtszunahme von 6 bis 10 g zu Embryonaltag E1 aufzeigten. Der Tag der Geburt entsprach Postnataltag P0 und alle weiteren Tage P1 bis PN.

Zur Entnahme von Gewebeproben wurde den Mäusen 1 ml Chloralhydratlösung (10 % Chloralhydrat in PBS) intraperitoneal injiziert. Durch Zwicken in die Zehenzwischenräume wurde sichergestellt, dass die Tiere ausreichend tief narkotisiert waren und keinerlei Schmerzreaktion mehr aufwiesen. Nun wurde der Kopf abgetrennt und das adulte Gehirn herauspräpariert oder durch Eröffnen des Bauchraums und des Peritoneums die Embryonalkette herauspräpariert. Alle weiteren Präparationsschritte zum Gewinnen embryonalen Gewebes erfolgten unter der Sterilbank in sterilfiltrierten Lösungen und mit keimreduziertem Präparationsbesteck.

3.14 Molekularbiologische Methoden

3.14.1 Erzeugung eines GFP-markierten Plasmids mit einer vollständigen DISC1-Sequenz

Die vollständige Sequenz des murinen DISC1-Proteins wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus pCAX amplifiziert und im Anschluss daran in die Vektoren pEGFP-C1 und pmRFP-C1 kloniert.

3.14.1.1 PCR zur Vervielfältigung einer DISC1-DNA-Sequenz

Für die PCR wurden 1 µl pCAX Plasmid mit 16,5 µl A. bidest., 2,5 µl 10x Polymerasepuffer, 2 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl 25 mM dNTPs, 1 µl 25 mM forward Primer (Sequenz: CTCGAGCTATGCAGGGCGGGGTCCCCG), 1 µl 25 mM reverse Primer (Sequenz: TCTAGATCAGGCCTCGGTTTCCTGAGCACCA) und 0,3 µl Hot Start Taq Polymerase vermischt. Die Aktivierung der Polymerase erfolgte durch eine 15-minütige Inkubation des gesamten Ansatzes bei 95° C, welcher ein PCR-Programm mit 35 Zyklen folgte. Diese Zyklen bestanden aus folgenden Phasen: Einer 30 s Degradation bei 95° C, einem 30 s Annealing bei 57° C und einer 1-minütigen Elongation bei 72° C, sowie eines einmaligen Elongationsschrittes am Ende von 15 min bei 72° C. Das PCR-Produkt wurde mit 1 µl Ladepuffer auf ein 1 %-iges Agarosegel geladen und mittels Gelelektrophorese (45 min,

140 V in TAE-Puffer) aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Bestrahlung mit Hilfe einer CCD-Kamera.

3.14.1.2 Transformation der DISC1-Sequenz in *E. coli*

Um die gewonnene DISC1-DNA mit GFP- bzw. RFP-Markierung in NIH3T3 Fibroblasten transfizieren zu können, musste die DNA gereinigt, in einen Vektor mit den entsprechenden Markierungen kloniert, und diese in *E. coli* transformiert werden.

Die unter 3.14.1.1 amplifizierte DNA-Sequenz wurde mittels Na-Acetat-Fällung gereinigt. Hierfür wurden 4 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2) mit 300 µl Isopropanol und 45 µl des PCR-Produktes gemischt und 10 min bei 12.000 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen. Das Pellet zweimal mit 200 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen, und 5 min bei 12.000 g zentrifugiert. Das Produkt wurde nun 10 min bei 37° C getrocknet und in 20 µl A. bidest. resuspendiert. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Nanophotometer.

Restriktion der DISC1-DNA-Sequenz und der Vektoren pEGFP-C1 und pmRFP-C1

Die gereinigte DNA-Sequenz wurde im Anschluss geschnitten. Dazu wurden 19 µl des gereinigten PCR-Produkts mit 33 µl A. bidest, 4 µl Fastdigest Puffer, 2 µl XhoI und 2 µl XbaI für 2 h bei 37° C inkubiert, mit einer angeschlossenen Inaktivierung der Enzyme von 10 min bei 70°C. Nach dem Schneiden wurde eine erneute Aufreinigung der DNA mittels Na-Acetat-Fällung durchgeführt.

An das Schneiden der DISC1 DNA-Sequenz schloss sich die Restriktion der Vektoren an. Dazu wurden 2 µl des jeweiligen Plasmids mit 3 µl fastdigest Puffer, 1 µl XhoI, 1 µl XbaI und 23 µl A. bidest. gemischt und für 2 h bei 37° C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine einstündige Dephosphorylierung des Plasmids mittels SAP, welche durch eine Inkubation von 10 min bei 70° C gestoppt wurde. Das geschnittene Plasmid wurde durch Na-Acetat-Fällung aufgereinigt und die Konzentration mittels Nanotrop bestimmt.

Ligation des jeweiligen Vektors mit der vollständigen DISC1-Sequenz

Nach den Restriktionen der DNA und des Vektors wurden die gereinigten Produkte ligiert. Die Ligation bestand aus folgendem Ansatz: 0,5 µl des pEGFP-C1 bzw. pmRFP-C1 Vektors, 5 µl der DISC1-Sequenz, 2 µl Ligationspuffer, 1 µl Ligase, 12 µl A. bidest. und wurde bei 37° C für 1 h durchgeführt. Das entstandene Produkt wurde bei -20° C gelagert.

Transformation von E. coli mit den Vektoren

Die Transformation des Ligationsproduktes erfolgte in chemokompetente *E. coli*. Dazu wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut, und 50 µl der Bakterienkulturlösung mit 5 µl des Ligationsansatzes für 15 min auf Eis inkubiert. Dieser Inkubation schloss sich ein 42° C heißer Hitzeschock für 30 s an, welcher durch Abschrecken der Bakterien auf Eis beendet wurde. Die Zellen wurden nun mit 500 µl SOC-Medium für 1 h bei 37 °C inkubiert, und anschließend auf LBAMP-Platten 12 h bei 37° C kultiviert. Die Platten wurden im Anschluss in einer Plasmidpräparation verwendet.

3.14.1.3 Plasmidpräparation

Die in der unter 3.14.1.2 beschriebenen Transformation gewonnenen Bakterienkolonien wurden mittels Kolonie-PCR auf enthaltene Plasmide hin untersucht. Dabei wurde 1 µl der jeweiligen Kolonie mit 0,3 µl Hot Start Taq Polymerase, 1 µl dNTPS, 2,5 µl 10x Polymerasepuffer, 18,5 µl A. bidest., 1 µl 25 mM forward Primer (Sequenz: CTCGAGCTATGCAGGGCGGGGTCCCCG) und 1 µl 25 mM reverse Primer (Sequenz: TCTAGATCAGGCCTCGGTTTCCTGAGCACCA) gemischt. Die Aktivierung der Polymerase erfolgte durch eine 3-minütige Inkubation des gesamten Ansatzes bei 94° C, welcher ein PCR-Programm mit 35 Zyklen folgte. Diese Zyklen bestanden aus folgenden Phasen: Einer 1-minütigen Degradation bei 94° C, einem 1-minütigem Annealing bei 60° C und einer 1-minütigen Elongation bei 72° C sowie eines einmaligen Elongationsschrittes von 15 min am Ende bei 72° C. Das PCR-Produkt wurde mit 1 µl Ladepuffer auf ein 1 %-iges Agarosegel geladen und mittels Gelelektrophorese (45 min, 140 V in TAE-Puffer) aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Bestrahlung mit Hilfe einer CCD-Kamera.

E. coli Klone, welche den pEGFP-C1 bzw. pmRFP-C1 Vektor mit DISC1-DNA-Sequenz enthielten, wurden in 1,5 ml LB-Flüssigkulturen aufgenommen und 12 h bei 37° C inkubiert. Diese 1,5 ml Kulturen wurden im Anschluss 30 s bei 11.000 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl Zelllysepuffer durch Auf- und Abpipettieren gelöst. Um die Fragmentierung der Plasmide zu vermeiden, wurde nun, ohne Durchmischen, 250 µl des Kit-Puffer A2 zugegeben und das Lysat für 5 min bei 22° C inkubiert. Nun wurden 300 µl des Puffers A3 zugegeben und das Gemisch durch 8x Invertieren des Reaktionsgefäßes durchmischt. Im Anschluss daran wurde das entstandene Lysat für 10 min mit 11.000 g zentrifugiert. 750 µl des entstandenen Überstandes wurden auf eine NucleoSpin-Säule geladen, welche in ein 2 ml Reaktionsgefäß platziert wurde. Die

beladene Säule wurde 1 min mit 11.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säulenmembran wurde durch die Zugabe von 600 µl Kit-Puffer A4 und Zentrifugieren für 1 min mit 11.000 g gereinigt und im Anschluss mittels Zentrifugation für 2 min mit 11.000 g getrocknet. Abschließend wurde die Plasmid-DNA von der Säule gewaschen. Hierfür wurden 50 µl A. bidest. auf die Säule gegeben und diese 1 min mit 11.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss, welcher die Plasmid-DNA enthielt, wurde bei -20° C gelagert.

Um die erfolgreiche Plasmidpräparation sicherzustellen, erfolgte ein Restriktionsverdau und eine anschließende Kontroll-PCR. Für den Verdau wurden 4 µl des eluierten Plasmides mit 10 µl des Restriktionsenzym *Hind*III, 2 µl 10x Reaktionspuffer und 13 µl A. bidest. versetzt und 3 h bei 37° C inkubiert. Der Restriktionsverdau wurde durch eine 10-minütige Inkubation bei 70° C gestoppt.

In der Kontroll-PCR wurden 2 µl des geschnittenen Plasmides mit 1 µl Hot Start Taq Polymerase, 1 µl dNTPS, 2,5 µl 10x Polymerasepuffer, 12,5 µl A. bidest., 2,5 µl 25 mM forward Primer (Sequenz: CTCGAGCTATGCAGGGCGGGGGTCCCCG) und 2,5 µl 25 mM reverse Primer (Sequenz: TCTAGATCAGGCCTCGGTTTCCTGAGCACCA) gemischt. Die Aktivierung der Polymerase erfolgte durch eine 5-minütige Inkubation des gesamten Ansatzes bei 94° C, welcher ein PCR-Programm mit 35 Zyklen folgte. Diese Zyklen bestanden aus folgenden Phasen: Einer 1-minütigen Degradation bei 94° C, einem 1-minütigem Annealing bei 60° C und einer 1-minütigen Elongation bei 72° C, sowie eines einmaligen Elongationsschrittes am Ende von 15 min bei 72° C. Das PCR-Produkt wurde mit 1 µl Ladepuffer auf ein 1 %-iges Agarosegel geladen und mittels Gelelektrophorese (45 min, 140 V in TAE-Puffer) aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Bestrahlung mit Hilfe einer CCD-Kamera.

3.14.2 Zellkulturen

3.14.2.1 Auftauen und Einfrieren der Zellen

Die NIH3T3 Fibroblasten wurden in Kryoröhrchen in 90 % FBS und 10 % DMSO bei 196° C aufbewahrt. Zum Auftauen wurden 1 ml Zelllösung im Wasserbad bei 37° C erwärmt und im Anschluss in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit 4 ml Zellkulturmedium versetzt. Diese Zellsuspension wurde bei 400 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zell-Pellet mit 1 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in eine Petrischale mit 10 ml Medium inkubiert. Das Medium wurde am folgenden Tag erneuert.

Vor dem Einfrieren wurde das Medium aus den Petrischalen entfernt und die adhärennten Zellen mit 1 ml 0,25 %igem Trypsin für 5 min bei 22° C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 3 ml Medium zum Ansatz gegeben und die entstandene Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, um diese mit 400 g 5 min lang bei Raumtemperatur zu zentrifugieren. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen wurden in 1 ml kaltem Einfriermedium, bestehend aus 90 % FBS und 10 % DMSO, aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Diese Kryoröhrchen wurde in eine Isopropanol-Kammer gegeben und für 12 h bei -80° C heruntergekühlt, bevor sie in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von -196° C gelagert wurden.

3.14.2.2 Kultivierung der Fibroblasten

Die Zellen wuchsen adhärent in Petrischalen mit 10 ml Zellkulturmedium und wurden in einem Inkubator, welcher über eine mit Wasserdampf gesättigte Atmosphäre mit 5 % CO₂ verfügte, bei 37° C inkubiert. Alle 2 Tage wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und neue 10 ml Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden passagiert, wenn sie zu 80 % konfluent gewachsen waren. Hierzu wurden sie mit PBS gewaschen, mit 1 ml 0,25 %igem Trypsin 5 min versetzt, um die Zell-Zell-Kontakte zu lösen, und diese Zellsuspension im Anschluss in 3 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde nun 5 min mit 400 g zentrifugiert; der Überstand verworfen, und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf eine neue Petrischale gegeben und mit 10 ml Zellkulturmedium versetzt.

3.14.2.3 Transfektion von Fibroblasten in Zellkulturen

Die verwendeten NIH3T3 Fibroblasten wurden nach dem Auftauen einmal passagiert. Als die erste Passage erneut 80 % konfluent gewachsen war, wurden die Zellen für die Transfektion verwendet. Hierfür wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit D-MEM/F12 Medium ohne FBS und Antibiotika inkubiert. Der Transfektionsansatz bestand aus 16 µg Plasmid-DNA; hierbei handelte es sich um einen Plasmidvektor ohne Insert als Kontrolle oder einen Plasmidvektor mit einem Insert, welches die Sequenz von DISC1 trug. Die jeweilige Vektor-DNA wurde in 1 ml Opti-MEM Medium aufgenommen. Nun wurden 40 µl Lipofectamin 2000 mit 1 ml Opti-MEM Medium gemischt und 5 min bei 22° C inkubiert. Diese beiden Ansätze wurden vereinigt, vorsichtig durchmischt und für 20 min bei 22° C inkubiert. Für die Transfektion wurden 2 ml Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben und diese 5 h im Inkubator (welcher

über eine mit Wasserdampf gesättigte Atmosphäre mit 5 % CO₂ verfügte) bei 37° C inkubiert. Nach 5 h erfolgte ein Mediumwechsel zurück auf das Medium für Fibroblastenzellen, und eine weitere Inkubation im Inkubator für 48 h.

Die transfizierten Fibroblastenzellen wurden nun entweder für immunzytochemische Markierungen (3.16) oder Immunpräzipitationsversuche (3.14.7) verwendet.

3.14.3 Proteinextraktion aus Gewebe und Zellen

Die Zellen der Zellkultur bzw. die extrahierten Mausgehirne wurden in Lysepuffer aufgenommen, homogenisiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die entstandene Suspension wurde 20 min bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert, um die verbliebenen Zellreste zu entfernen. Der Überstand wurde anschließend bei -80 °C gelagert.

3.14.4 Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration wurde mittels MicroBC-Assay-Kit von Uptima durchgeführt. Dieser basiert auf dem BCA-Test (Smith et al., 1985). Hierbei handelt es sich um einen photometrischen Test, bei welchem, innerhalb eines alkalischen Mediums, an den Peptidbindungen gekoppeltes Cu²⁺ zu Cu⁺ reduziert wird. Die Menge des entstandenen Cu⁺-Komplex kann dann bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt werden. Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben erfolgte durch Extrapolation aus den Messwerten einer mitgeführten BSA-Eichreihe (10 / 7,5 / 5 / 2,5 / 1 / 0 µg/ml). Das Kit wurde nach Hersteller Protokoll verwendet.

3.14.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Dieses Verfahren dient der Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht innerhalb eines elektrischen Feldes (Laemmli, 1970). In dieser Arbeit wurde das XCell SureLock Mini Cell Elektrophoresesystem der Firma Thermo Fisher benutzt. Bei den verwendeten Gelen handelte es sich um 4–12 % NuPAGE Novex Bis-Tris Gele, welche in die Kammer montiert wurden. Anschließend wurde die äußere Kammer mit 700 ml MOPS-Puffer befüllt, die innere mit 200 ml MOPS-Puffer versetzt mit 500 µl Antioxidant. Vor dem Beladen wurden die Proben mit 4x Ladepuffer versetzt und 10 min bei 70 °C inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 200 V für 50 min. Dieser Auftrennung schloss sich das Blotten auf Nitrocellulose-Membranen an (Western Blot).

3.14.6 Western Blot

Zum Nachweis der mittels SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden diese durch das Western Blot Verfahren auf eine Membran aus Nitrocellulose übertragen (Towbin et al., 1979). Die Nitrocellulose-Membran und das Gel wurden kurz in Blotpuffer geschwenkt und dieser verworfen. Danach erfolgte eine Inkubation von Membran und Gel für 5 min in Blotpuffer. Nun wurden auf die Kathode zwei Schwämme gelegt, darauf zwei Lagen Whatmanpapier, auf welche das Gel gelegt wurde. Auf das Gel wurde nun die Membran gelegt und anschließend auf diese zwei Lagen des Whatmanpapiers aufgebracht, auf welchem wieder zwei Schwämme gelegt wurden. Abschließend wurde diese Konstruktion mit der Anode abgedeckt. Der Proteintransfer erfolgte durch Anlegen eines Stroms von 400 mA für 55 min. Um die entstehende Wärme abzuleiten erfolgte der Transfer auf Eis.

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran in TBS-T mit 5 % Magermilchpulver für 1 h bei 22 °C unter Schwenken blockiert. Im Anschluss wurde zum Detektieren der Proteine die Membran in TBS-T mit 5 % Magermilchpulver und jeweiligen Antikörpern (Kaninchen anti DISC1 1:200; Ziege anti DISC1 1:200; Ziege anti GFP 1:200; Maus anti Aktin 1:200) für 12 h bei 4 °C inkubiert, und danach viermal für 8 min in TBS-T gewaschen und mit dem jeweils entsprechenden sekundären biotinylierten Antikörper (Kaninchen anti Ziege; Pferd anti Maus; Ziege anti Kaninchen; jeweils 1:400) für 4 h bei 22 °C in TBS-T mit 5 % Magermilchpulver inkubiert. Im Anschluss wurde der ungebundene Antikörper, durch viermaliges Waschen mittels TBS-T für 8 min, entfernt. Die Farbreaktion zum Sichtbarmachen der Proteinbanden erfolgte mittels ABC-Kit der Firma Vector. Es wurde nach Hersteller-Anleitung die ABC Lösung hergestellt und für 30 min bei 4 °C inkubiert, im Anschluss die Membran für 30 min bei 22 °C darin geschwenkt. Die Membran wurde nun für 8 min in TBS-T gewaschen und in DAB-Puffer inkubiert, bis die Banden gut sichtbar waren (30 s bis 10 min). Abschließend wurde die Farbreaktion durch gründliches Waschen mittels destillierten Wassers abgestoppt und die Membran eingescannt.

3.14.7 Immunpräzipitation

Immunpräzipitation ist eine häufig benutzte Methode um Antigen-Antikörper-Komplexe zu analytischen Zwecken auszufällen. Das typische Prinzip ist es, eine Sepharosematrix mit Protein G zu beschichten; dieses bakterielle Protein ist in der Lage die konstanten Ketten von IgG-Antikörpern zu binden. Dadurch entsteht eine Matrix, an der ein spezifischer Antikörper gebunden ist. Gibt man nun ein Zelllysat auf diese Matrix, ist der gekoppelte Antikörper in der Lage, sein spezifisches Antigen zu erkennen und das Protein an die Matrix zu binden.

Durch Abwaschen des restlichen Zelllysats bekommt man so einen gereinigten Antigen-Antikörper-Komplex.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Catch and Release-System von Millipore verwendet. Das benötigte Zelllysate wurde aus unter Punkt 3.14.2.3 transfizierten NIH3T3 Zellen gewonnen, diese waren mit DISC1-GFP transfiziert. Die Methode der Zelllyse ist unter Punkt 3.14.3 Proteinextraktion aus Gewebe und Zellen beschrieben. Die Immunpräzipitation wurde nach der Anleitung des Kit-Herstellers durchgeführt. Die verwendeten Säulen wurden mit 485 µl Zelllysate beladen und 5 µl der jeweiligen Antikörperlösung, was in den Ansätzen eine Antikörperkonzentration von 1:100 ergab. Als Antikörper dienten in jeweils unterschiedlichen Ansätzen Kaninchen anti GFP, Kaninchen anti DISC1 und Ziege anti DISC1. Die Ansätze wurden für 12 h bei 4 °C schüttelnd inkubiert, um eine stabile Interaktion zwischen Membran, den jeweiligen Antikörpern und dem DISC1-GFP Protein zu gewährleisten. Das restliche Zelllysate wurde abgewaschen und verworfen. Der Antigen-Antikörper-Komplex konnte von der Säule gewaschen werden und mittels SDS-Page und folgendem Western Blot analysiert werden.

3.15 Herstellung primärer embryonaler Einzelzellen

Die Embryonen wurden aus dem zuvor entnommenen Uterus herauspräpariert und die Köpfe in kalten Krebspuffer (siehe 3.3) überführt. Nach dem Entfernen der Kopf- und Hirnhaut erfolgte die Freilegung des embryonalen Gehirns durch dessen Isolierung von der Schädelbasis. Nun erfolgte das Trennen der beiden Hemisphären vom Neuralrohr sowie das Entfernen der anterioren und posterioren Bereiche, wodurch nur das basale Telencephalon und der somatosensorische Cortex erhalten blieb. Die MGE wurde herauspräpariert und in HBSS-Glukose (0,65 % Glukose in HBSS) auf Eis aufgenommen. Im Anschluss daran erfolgte die Vereinzelung der Zellen, beginnend mit einer Trypsinreaktion in 0,05 % Trypsin in HBSS-Glukose für 17 min bei 37° C, wonach das Gewebe in Einzelzellmedium (10 % FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin 1 % L-Glutamin, 0,1 % D-Glukose in DMEM mit Natriumpyruvat und Pyridoxin) überführt wurde. Nun wurde das Gewebe mittels einer abgerundeten Pasteurpipette resuspendiert und durch ein GazeNetz (Maschenweite: 200 µm²) pipettiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Thomakammer. Die Neurone der MGE wurden mit einer Dichte von 45.000 Zellen/cm² auf HNO₃-gereinigten Deckgläschen kultiviert, welche vorher mit 19,5 µg/ml Laminin und 5 µg/ml Poly-L-Lysin in GBSS für 30 min beschichtet wurden. Nach Kultivierung für 2 h im Inkubator (37 °C und 5 % CO₂) wurde

1 ml Neurobasalmedium versetzt mit: 2 % B27 Supplement, 0,5 % D-Glukose, 2 % Penicillin/Streptomycin und 1 % L-Glutamin, zugegeben und nach einem Tag ein Wechsel des Mediums durchgeführt. Die Fixierung der Neurone erfolgte nach 2 Tagen für 30 min in 4 % PFA in PBS.

3.16 Immunhisto- und Immunzytochemische Methoden

3.16.1 Perfusion adulter Mäuse

Die adulten Tiere wurden mittels intraperitonealer Injektion mit 10 % Chloralhydrat in PBS betäubt. Nachdem durch Zwicken in die Zehenzwischenräume sichergestellt war, dass die Mäuse ausreichend narkotisiert waren und keinerlei Schmerzempfinden mehr vorlag, wurde eine transcardiale Perfusion durchgeführt, bei welcher der Thorax eröffnet und eine Kanüle in den linken Ventrikel geführt wurde. Durch diese Kanüle wurden ca. 2 min PBS und im Anschluss 4 % PFA in PBS bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 5 bis 8 ml/min 20 min lang geleitet. Es erfolgte das Abtrennen des Sinus venosus vom rechten Ventrikel um den Abfluss des PBS sowie des Fixativs zu gewährleisten. Danach wurde das Gehirn herauspräpariert und in 4 % PFA in PBS 12 h bei 4 °C nachfixiert. Es folgte eine Inkubation bei 10 % und 30 % Sucrose in PBS jeweils für ca. 24 h bei 4 °C.

3.16.2 Fixieren, Einfrieren und Herstellen von Kryostatschnitten aus Hirngewebe

Embryonale Gehirne wurden wie unter 3.13 und 3.15 beschrieben präpariert und in 4 % PFA in PBS bei 4 °C für 12 h fixiert, und im Anschluss in 10 % und 30 % Sucrose in PBS jeweils ca. 24 h bei 4 °C inkubiert, oder frisch ohne Fixierung und Inkubation eingefroren. Das Einfrieren embryonaler und adulter Gehirne erfolgte in -45 °C kaltem Isopentan für 1 min. Die unfixierten Gehirne wurden sofort geschnitten, die fixierten bis zum Anfertigen von Kryoschnitten bei -80 °C gelagert. Der Kryostat wurde auf -22 °C heruntergekühlt und die Gehirne mit Tissue Taq aufgeblickt, um 18 µm dicke Schnitte anzufertigen. Nachdem die Schnitte 30 min getrocknet waren, wurden diese bei -20 °C gelagert oder es schloss sich direkt eine immunhistochemische Markierung an.

3.16.3 Immunhistochemie an Kryostatschnitten

Die bei -20 °C gelagerten Kryostatschnitte wurden 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut oder direkt nach Beendigung des Schneidens sowie des Trocknens 3x 15 min in 0,2 % Triton X 100 in PBS gewaschen. Unfixiert geschnittene Gehirne wurden vor dem

Waschen 15 min mit 2 % PFA in PBS nachfixiert. Danach erfolgte eine Blockierung in 5 % BSA, 10 % Esel- bzw. Ziegen Serum, 0,2 % Triton X-100 in PBS für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Daran schloss sich die Primärantikörperreaktion bei 4 °C über 12 h an. Hierfür wurden die Primärantikörper in Blockierungslösung verdünnt (Ziege anti DISC1 1:30; Kaninchen anti DISC1 1:50; Maus anti TAG-1 1:100) und ein Volumen von 200 µl auf jeden Objektträger pipettiert. Am nächsten Morgen wurde erneut 3x 15 min in 0,2 % Triton X-100 in PBS gewaschen, woran sich die Sekundärantikörperreaktion für 2 h bei Raumtemperatur anschloss. Die Sekundärantikörper wurden ebenfalls mittels Blockierungslösung verdünnt (Cy3 Esel anti Ziege 1:2000; Ziege anti Kaninchen Dylight 1:2000; Cy3 Esel anti Kaninchen 1:1000; Ziege anti Maus Dylight 1:250), in einem Volumen von 200 µl pro Objektträger aufgebracht und in einer feuchten Kammer inkubiert. Es erfolgten weitere 3 Waschschrte, je 15 min in 0,2 % Triton X-100 in PBS, an welche sich das Färben der Zellkerne mittels 4',6-Diamidin-2-phenylinol (DAPI) 1:1000 in PBS, ein Spülen in A. dest. und das Eindecken in Mowiol anschloss.

Auswertung der Kryostatschnitte

Die mittels Antikörper markierten Zellen wurden mit einem Zeiss LSM510 (Axiovert-S200. Plan Apochromat x63 Ölimmersionsobjektiv NA: 1,4), die gesamten Schnitte mit einem Zeiss LSM510 (C-Apochromat x10 Wasserimmersionsobjektiv NA: 0,45) bei den Anregungs-wellenlängen von 488 nm und 543 nm gescannt. Für den Nachweis des DAPI-Signals diente ein Mai Tai-Laser der Firma Spectra-Physics bei 690 nm. Bei der Zählung der kortikalen Zellen, in welchen eine DISC1-Markierung vorlag, wurde als Gesamtzellzahl die Menge der mit DAPI markierten Zellkerne gleich 100 % gesetzt, und der Anteil der DISC1-markierten Neurone im Kortex wurde als Prozentsatz berechnet. Schnitte durch den embryonalen Augapfel, die Retina und den Sehnerv wurden mit einem Axiovert-S100 (Plan Neofluar x20 Objektiv NA: 0,5; Zeiss) in Kombination mit einer SPOT Kamera mikroskopiert.

3.16.4 Immunzytochemie an embryonalen Einzelzellen

Die zwei Tage kultivierten Einzelzellen wurden mittels 4 % PFA in PBS fixiert, 3 x 5 min in 0,2 % Triton X-100 in PBS auf einem Schüttler bei Raumtemperatur gewaschen und in Blockierungslösung (10 % Ziegen-, Esel Serum, 5 % BSA und 0,2 % Triton X-100 in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Daran schloss sich die Primärantikörperreaktion in Blockierungslösung (Maus anti E7-S-β-Tubulin 1:100; Ziege anti DISC1 1:25;

Kaninchen anti DISC1 1:100; Kaninchen anti Lis1 1:50) für 12 h bei 4 °C an. Im Anschluss wurden die ungebundenen Antikörper in 4 Waschschritten à 10 min mittels 0,2 % Triton X-100 in PBS bei RT auf einem Schüttler entfernt. Nun folgte die Sekundärantikörperreaktion in Blockierungslösung (Esel anti Ziege Cy3 1:2000; Ziege anti Kaninchen Dylight 1:2000; Esel anti Maus Dylight 1:1000) für 2 h bei RT; an dieser Stelle fand zusätzlich eine Phalloidin-Rhodamin-Färbung 1:2000 in der entsprechenden Blockierungslösung statt. Nach der zweiten Antikörperreaktion folgten 5 weitere Waschschrritte in 0,2 % Triton X-100 in PBS von jeweils 10 min bei RT auf einem Schüttler, ein Waschschrtritt in DAPI (1:1000) in PBS, ein kurzes Eintauchen in A. dest. und das Eindecken in Mowiol.

Auswertung der Fluoreszenz

Die mittels Antikörper markierten Interneurone wurden mit einem Zeiss LSM510 (Axiovert-S200. Plan Apochromat x63 Ölimmersionsobjektiv NA: 1,4) auf ihren Deckgläschen bei den Anregungswellenlängen von 488 nm und 543 nm gescannt. Für den Nachweis des DAPI-Signals diente ein Mai Tai-Laser der Firma Spectra-Physics bei 690 nm.

3.16.5 Immunzytochemie an NIH3T3 Fibroblasten

Die transfizierten Fibroblastenkulturen (wie unter 3.14.2.3 Transfektion von Fibroblasten in Zellkulturen beschrieben) wurden zwei Tage kultiviert und mittels 4 % PFA in PBS fixiert, 3x 5 min in 0,2 % Triton X-100 in PBS auf einem Schüttler bei Raumtemperatur gewaschen und in Blockierungslösung (10 % Ziegen-, Eselserum, 5 % BSA und 0,2 % Triton X-100 in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Daran schloss sich die Primärantikörperreaktion in Blockierungslösung (Ziege anti DISC1 1:25; Kaninchen anti DISC1 1:100; Kaninchen anti Lis1 1:50) für 12 h bei 4 °C an. Im Anschluss wurden die ungebundenen Antikörper in 4 Waschschrritten à 10 min mittels 0,2 % Triton X-100 in PBS bei RT auf einem Schüttler entfernt. Nun folgte die Sekundärantikörperreaktion in Blockierungslösung (Esel anti Ziege Cy3 1:2000; Ziege anti Kaninchen Dylight 1:2000; Esel anti Kaninchen Cy3 1:1000) für 2 h bei RT. Nach der zweiten Antikörperreaktion folgten 5 weitere Waschschrritte in 0,2 % Triton X-100 in PBS von jeweils 10 min bei RT auf einem Schüttler, ein Waschschrtritt in DAPI (1:1000) in PBS, ein kurzes Eintauchen in A. dest. und das Eindecken in Mowiol.

Auswertung der Fluoreszenz

Die mittels Antikörper markierten Fibroblasten wurden mit einem Zeiss LSM510 (Axiovert-S200. Plan Apochromat x63 Ölimmersionsobjektiv NA: 1,4) auf ihren Deckgläschen bei den Anregungswellenlängen von 488 nm und 543 nm gescannt. Für den Nachweis des DAPI-Signals diente ein Mai Tai-Laser der Firma Spectra-Physics bei 690 nm.

4 Ergebnisse

4.1 Der Nachweis von exogenem DISC1 in NIH3T3 Fibroblasten

Als erstes wurde der Nachweis erbracht, dass die hier verwendeten DISC1-Antikörper spezifisch an DISC1 binden. Dazu wurden NIH3T3 Fibroblasten mit Maus-DISC1 transfiziert. Das translatierte DISC1-Protein war mit GFP gekoppelt (GFP-DISC1) und konnte so durch durchgeführte immunzytochemische Markierungen nachgewiesen werden. Dabei konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression von DISC1 zu unlöslichen Proteinaggregaten führt, welche in Aggresomen rekrutiert werden (Atkin und Kittler 2012). Wie in Abbildung 6 zu sehen, zeigt sich in konfokaler Lasermikroskopie in der gesamten Zelle ein Punktmuster von GFP-DISC1. Markierungen mit beiden Antikörpern führte zur vollständigen Deckungsgleichheit von grünen GFP-Punkten und roten Antikörpersignalen (Abbildung 6A, B). Wenn Fibroblasten so transfiziert wurden, dass sie ausschließlich GFP ohne DISC1 exprimierten fand sich keine Kolo-kalisation von GFP und Antikörpermarkierung. Die Überlagerung der Antikörpersignale und des GFP-Signals zeigt, dass beide Antikörper in der Lage sind, Maus-DISC1 in Immunzytochemie zu detektieren.

Als ein weiterer Nachweis der Antikörperspezifität und um die Verwendbarkeit der Antikörper in molekularbiologischen Versuchen sicherzustellen, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt und im Anschluss mittels einer Western Blot-Analyse ausgewertet. Die Präzipitationen wurden mit den gleichen transfizierten Fibroblasten, wie in der Immunzytochemie eingesetzt, durchgeführt und Antikörper direkt gegen den GFP-Teil gerichtet. GFP-DISC1 konnte so von beiden DISC1-Antikörpern nachgewiesen werden. Umgekehrt führten Präzipitationen mit beiden DISC1-Antikörpern und den anschließenden Nachweisen mittels eines GFP-Antikörpers zu den gleichen Ergebnissen (Abbildung 6C).

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass beide Antikörper in der Lage sind, exogen exprimiertes Mäuse-DISC1 spezifisch zu detektieren.

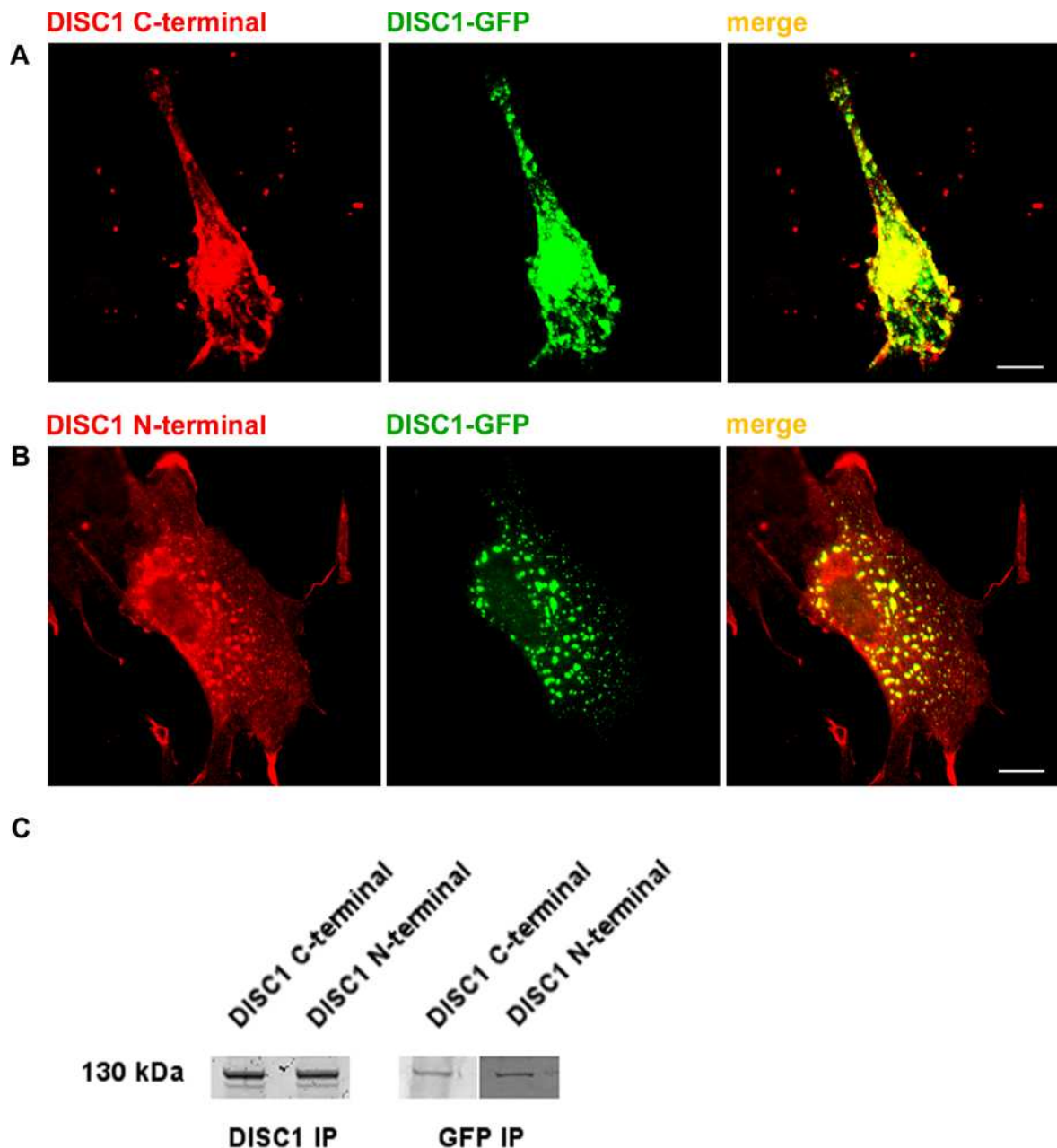


Abbildung 6 Transfektion von GFP-DISC1 in NIH3T3 Fibroblasten

NIH3T3 Fibroblasten wurden mit GFP markiertem DISC1 transfiziert, welches die gesamte Aminosäuresequenz des Proteins enthielt. Im Anschluss daran wurde eine Antikörpermarkierung gegen DISC1 und GFP durchgeführt. **(A)** Das Signal des C-terminalbindenden Antikörpers gegen DISC1 war kolokalisiert mit dem GFP-Signal. **(B)** Der N-terminalbindende Antikörper gegen DISC1 war ebenfalls in der Lage transfiziertes Protein nachzuweisen. Bei der Transfektion kam es zu einer Aggresomenbildung, welche sich im Zytosol um den Zellkern ablagerten (A B). Die transfizierten Fibroblasten wurden einer Immunpräzipitation unterzogen, dabei sowohl mit einem Antikörper gegen GFP als auch den beiden DISC1-Antikörpern präzipitiert und im Anschluss daran die Präzipitate in einem Western Blot aufgetrennt **(C)**. Dabei wurde bei einer Präzipitation mit GFP im Western Blot eine 130 kDa große Bande mit beiden DISC1-Antikörpern nachgewiesen. Diese entspricht dem Fusionsprotein von DISC1 und GFP. Das gleiche Ergebnis wurde erzielt bei Präzipitationen mit den DISC1-Antikörpern und einem Western Blot mit einem GFP-Antikörper. Die Maßbalken in A und B entsprechen 5 μ m.

4.2 Die Expression von DISC1 im adulten Mäusegehirn

Ältere Studien, welche die Expressionsmuster von DISC1 untersucht haben, beschrieben das Vorkommen des Proteins hauptsächlich in folgenden Teilen des Gehirns: im Telencephalon, einschließlich des Kortex, dem Hippocampus, dem Bulbus olfactorius sowie dem Cerebellum (Ishizuka et al. 2006). In Übereinstimmung mit diesen Arbeiten zeigten die hier verwendeten Antikörper für den C- und N-Terminus von DISC1 starke Signale in den oben genannten Regionen.

4.2.1 DISC1 Expression im adulten Hippocampus

Wie Abbildung 7A zeigt, war ein starkes immunhistochemisches Signal in putativen Pyramidenzellen der Corni ammoni (CA) 1–3 Regionen des Ammonshorns und in den Körnerzellen des Gyrus dentatus im Hippocampus nachweisbar. Beide DISC1-Antikörper markierten dieselben Regionen innerhalb des Hippocampus, aber insgesamt ging hier ein wesentlich stärkeres Signal vom N-terminalen als vom C-terminalbindenden Antikörper aus. Solche Expressionsmuster bei Mäusen zeigten auch Meyer und Morris mit zwei Antikörpern, von denen einer ein Epitop am C-terminalen Ende und einer eins im Mittelteil von DISC1 erkannten. Schurov kam zu ähnlichen Ergebnissen mit einem Antikörper gegen den Aminosäuresequenzabschnitt 734–754 von Maus-DISC1 (Meyer und Morris 2008, Schurov et al. 2004). Im menschlichen Gehirn von Erwachsenen konnte DISC1 in den Pyramidenzellen der CA 1–3 Regionen des Hippocampus und in den Körnerzellen des Gyrus dentatus nachgewiesen werden. Hierfür wurde ein Antikörper gegen die N-terminalen Aminosäurereste (191–203) von humanem DISC1 verwendet, welches zu sehr starken Signalen führte (James et al. 2004).

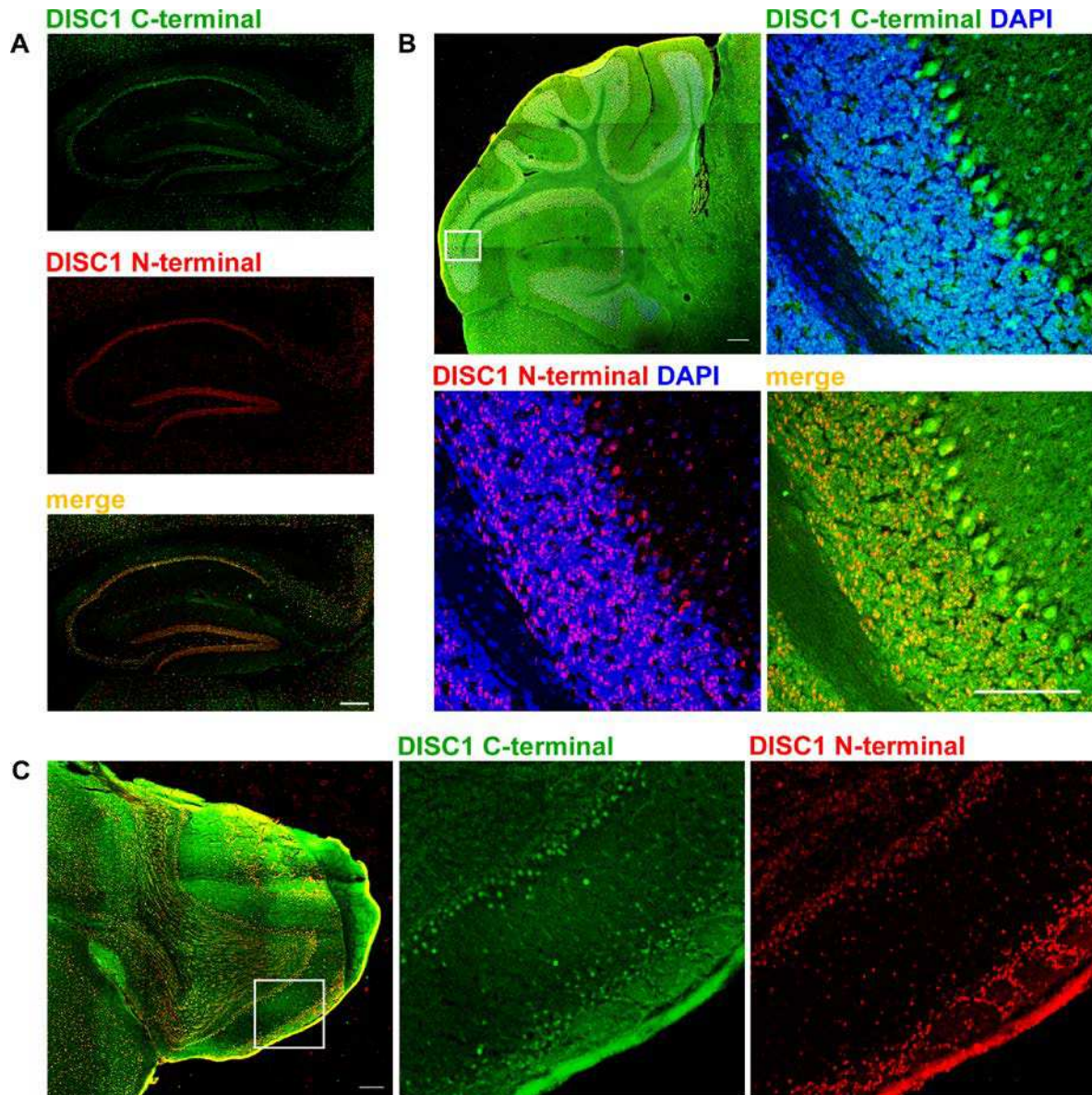


Abbildung 7 Konfokalmikroskopie des adulten Mausgehirns, zeigt die Immunhistochemie von DISC1 in verschiedenen Bereichen

(A) Markierung der beiden verwendeten DISC1-Antikörper an Schnitten des Hippocampus. Beide Antikörper markierten DISC1 in den Körnerzellen, was zu einem kolokalisierten Signal führte. Weiterhin markierte der C-terminalbindende Antikörper DISC1 in Zellen des Stratum lacunosum-moleculare. (B) Der Übersichtsscan des Cerebellums zeigt, dass hier das DISC1-Signal gleichmäßig über das gesamte Cerebellum detektiert werden kann. Die drei Vergrößerungen des ausgewählten Bereichs (weißes Quadrat) zeigen, dass mit beiden Antikörpern DISC1 in den Purkinje-Zellen, Zellen der Körner- und einigen Zellen der Molekularschicht markiert werden. Die Signale in diesem Bereich des Gehirns sind kolokalisiert (merge). (C) Bulbus olfactorius. Markierung von DISC1 in den periglomerulären Neuronen und Tufted-Zellen sowie den Mitralzellen der plexiformen Schicht. Der C-terminalbindende DISC1-Antikörper markierte auch DISC1 in den Axonen der Glomeruli. Die Maßbalken entsprechen 200 μm .

4.2.2 DISC1-Expression im adulten Cerebellum

Die Purkinje-Zellen des Cerebellums wurden sowohl von dem N-terminal- als auch dem C-terminalbindenden DISC1-Antikörper markiert (Abbildung 7B). Zusätzlich wurden einige, jedoch nicht alle, der kleineren Zellen in der Molekular- und Körnerschicht von beiden Antikörpern markiert (Abbildung 7B). Diese Expressionsmuster konnte die Gruppe um Schurov in gleicher Weise zeigen (2004). Allerdings stehen diese Ergebnisse nicht im Einklang mit einer Studie von Ma et al. (2002), die das Vorkommen von DISC1 mittels mRNA-Expression untersuchte. In der Arbeit von Ma et al. wurde mittels in-situ-Hybridisierung eines kleinen Stücks Maus-DISC1, die Expression von DISC1 nur in kleinen Zellen, welche die Purkinje-Zellen umgeben, nachgewiesen; die Purkinje-Zellen selbst waren frei von DISC1. Da in diesen kleinen Zellen kein NeuN nachgewiesen werden konnte, gingen die Autoren davon aus, dass es sich hier um Bergmann-Glia in der Purkinje-Zellschicht handeln muss, welche DISC1 mRNA exprimiert.

4.2.3 DISC1-Expression im Bulbus olfactorius

Im Bulbus olfactorius, dem sogenannten Riechkolben, waren beide verwendeten Antikörper in der Lage Tufted-Zellen und periglomeruläre Neurone zu markieren. Dieses Ergebnis ermöglichte es, die olfaktorischen Glomeruli klar darzustellen und damit die charakteristische modulare Organisation dieser Gehirnregion (Abbildung 7C). Es konnte durch in-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie gezeigt werden, dass es sich bei diesen Zellen um Interneurone handelt (Ma et al. 2002). In der hier vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass DISC1 in den Mitralzellen und einigen Zellen der externen plexiformen Schicht exprimiert wird.

Allerdings wiesen die beiden in dieser Arbeit verwendeten Antikörper einen entscheidenden Unterschied in ihrem Markierungsverhalten des Riechkolbens auf. Nur der C-terminale, nicht aber der N-terminale Antikörper, war in der Lage die Axone in den Glomeruli zu markieren. Das Färbeverhalten des C-terminalen DISC1-Antikörpers, in Bezug auf axonale Signalwege, ins besondere während der Gehirnentwicklung, ist ein Alleinstellungsmerkmal dieses Antikörpers gegenüber des N-terminalbindenden und wird im Kapitel 4.4 dieser Arbeit genauer betrachtet.

4.2.4 DISC1-Expression im adulten Kortex

Im Kortex von adulten Mäusen wurden Zellen durch beide verwendeten Antikörper markiert und zwar gleichmäßig verteilt in allen kortikalen Regionen und allen Schichten der Großhirnrinde (Abbildung 8A). Dieses Ergebnis steht in einem klaren Kontrast zu älteren Arbeiten, welche DISC1 hauptsächlich in den oberen Schichten des Kortex nachwiesen (Ma et al. 2002, Austin et al. 2004, Schurov et al. 2004).

Eine quantitative Analyse zeigte allerdings, dass es hier klare Unterschiede im immunhistochemischen Nachweis von DISC1 zwischen den beiden Antikörpern gab. Wie die Abbildung 8A zeigt, markierte der C-terminalbindende Antikörper 51,4 % aller Zellen des Kortex, wohingegen nur 30,0 % der kortikalen Neurone vom N-terminalbindenden Antikörper erkannt wurden. Durch immunhistochemische Markierungen von kortikalen Schnitten, bei welchen beide Antikörper gleichzeitig eingesetzt wurden, konnte gezeigt werden, dass alle vom N-terminalen Antikörper markierten Zellen auch mit dem Signal des C-terminalen kolokalisiert waren (Abbildung 8A). Die beiden Antikörper weisen in der Großhirnrinde von adulten Mäusen, in einer bestimmten Population von Zellen, DISC1 gemeinsam nach. Zusätzlich zu dieser Zellpopulation gibt es Zellen im Kortex in denen DISC1 nur vom C-terminalbindenden Antikörper detektiert werden kann.

4.2.5 Die Expression von DISC1 in Interneuronen des adulten Kortex

Um zu untersuchen bei wie vielen der unter 4.2.4 markierten Zellen des Kortex es sich um Interneurone handelt, wurde eine besondere GAD-GFP-Mauslinie verwendet. In dieser Mauslinie wurde die Glutamat-Decarboxylase, welche die Decarboxylierung von Glutamat zu γ -Aminobuttersäure (GABA) katalysiert, mittels GFP markiert. Da diese Synthese in Interneuronen dazu dient deren Botenstoff bereitzustellen, ist dies eine gängige Methode zum Darstellen von Interneuronen. In den Großhirnrinden dieser Tiere waren 9 % aller Zellen mit GFP markiert. Von diesen GFP-positiven Interneuronen wurden 50 % wiederum vom C-terminalen DISC1-Antikörper erkannt. Man kann also sagen, dass 50 % der Interneurone DISC1 positiv waren (Abbildung 8B). Wie oben beschrieben, entspricht dies dem gleichen Verhältnis, wenn man die Gesamtheit der kortikalen Neurone betrachtet.

Ob der N-terminalbindende DISC1-Antikörper die Interneurone auf dieselbe Weise markiert konnte nicht überprüft werden. Denn um das GAD-GFP der Interneuronen darstellen zu können, war es nötig die Gehirnschnitte mit PFA zu fixieren; unter diesen Bedingungen zeigt der N-terminalbindende Antikörper allerdings keine Bindung. So war es unter diesen Fixierungsbedingungen nicht möglich, das Markierungsverhalten der beiden eingesetzten

Antikörper zu vergleichen. Allerdings konnten am Kortex von Wildtyp-Mäusen, wie oben beschrieben, gezeigt werden, dass das N-terminale Signal mit dem des C-terminalen Antikörpers kolokalisiert ist. Man kann folgerichtig davon ausgehen, dass alle Interneurone, welche DISC1 exprimierten, vom C-terminalen DISC1-Antikörper erkannt wurden.

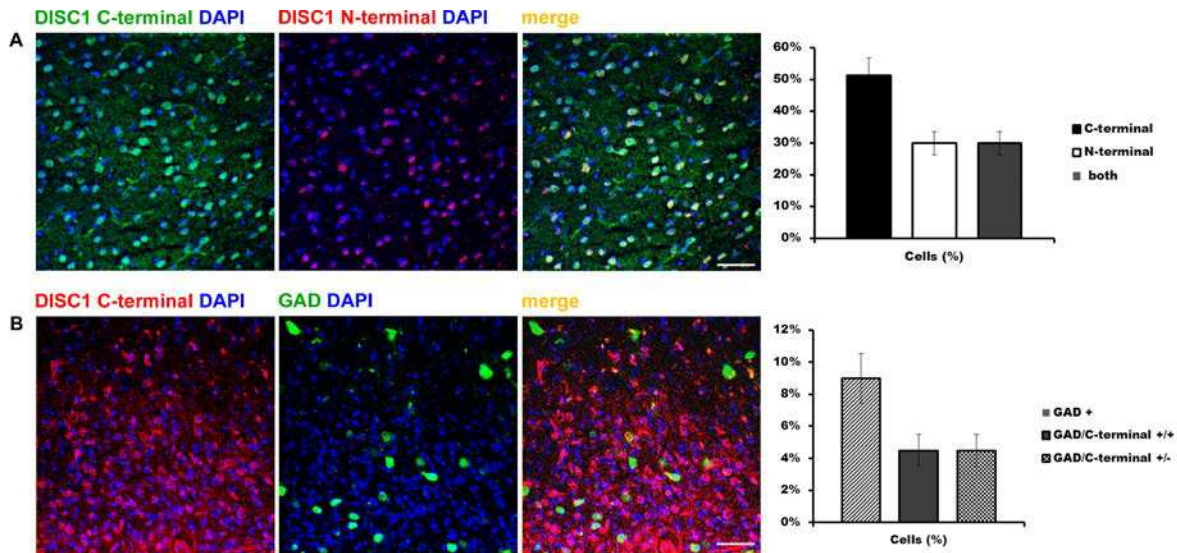


Abbildung 8 Konfokalmikroskopie von DISC1-Markierungen im adulten Mauskortex

Gezeigt wird beispielhaft ein Ausschnitt des visuellen Kortex (V1), da keine erkennbaren Unterschiede zwischen den verschiedenen Abschnitten des Neokortex oder seinen Schichten bestanden. **(A)** Beide Antikörper waren in der Lage DISC1 in Zellen des Kortex zu detektieren. In wesentlich mehr Zellen wurde DISC1 durch den C-terminalbindenden Antikörper nachgewiesen (50 % aller kortikalen Neurone). Alle Zellen, in denen DISC1 vom N-terminalbindenden Antikörper erkannt wurde, wurden auch vom C-terminalbindenden detektiert. **(B)** Unter der Verwendung einer GAD-GFP-Mauslinie, in welcher die Interneurone GFP markiert sind, konnte gezeigt werden, dass 9 % der Neurone GAD exprimierten, also Interneurone waren. In der Hälfte dieser Interneurone wurde DISC1 markiert; gleichzeitig ist zu erkennen, dass das DISC1-Signal nicht auf Interneurone beschränkt ist. Die Maßbalken entsprechen 50 µm.

4.3 Die Expressionsmuster von DISC1 im sich entwickelnden Gehirn

4.3.1 Western-Blot-Analysen von verschiedenen Altersstadien der Maus

Die Gehirnentwicklung wird nicht im Embryonalstadium abgeschlossen, sondern setzt sich nach der Geburt fort. Um die DISC1-Expression während der gesamten Entwicklung zu analysieren, wurden Gehirne von verschiedenen Altersstadien lysiert und mittels Western-Blot-Analyse auf das Vorhandensein von DISC1 untersucht. Hierbei wurde darauf geachtet, dass alle wichtigen Entwicklungsphasen durch Proben abgedeckt waren. Für die embryonalen Stadien wurden Gehirne von Embryonaltag E12 sowie den Tagen E14 – E18 verwendet. Als Proben von neugeborenen Mäusen und Säuglingen dienten Gehirne von P0, P8, sowie P12. Für Jungtiere wurden Gehirne an Tag P28 verwendet. Die Gehirne von adulten Mäusen stammten von Tieren, die älter als 110 Tage waren (>P110).

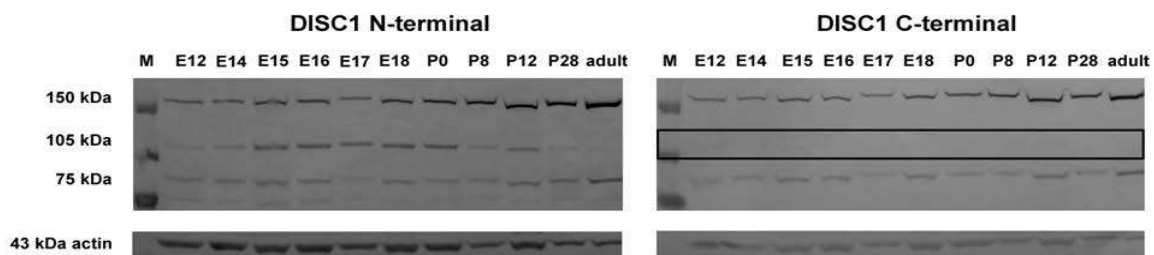


Abbildung 9 DISC1-Expression im gesamten Mausgehirn während verschiedener Entwicklungsstadien

Die Hirnlysate wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen (Embryonaltag E12—adult) und in Western Blots mit den beiden Antikörpern gegen DISC1 eingesetzt. Als Kontrollstandard wurde ein Antikörper gegen Aktin verwendet. Der N-terminalbindende DISC1-Antikörper erkannte drei Banden: eine 150 kDa, eine 105 kDa und eine 75 kDa große. Die Expression der 150 kDa großen Bande nahm während der Entwicklung zu, die der 105 kDa großen Bande war ab dem postnatalen Tag P8 nur noch schwach nachweisbar. Der C-terminalbindende DISC1-Antikörper markierte eine 150 kDa und eine 75 kDa Bande, die 105 kDa Bande wurde nicht von ihm erkannt; auch hier nahm die Expression der 150 kDa Bande über die Entwicklungszeit zu.

Wie in Abbildung 9 gezeigt, weist der N-terminalbindende DISC1-Antikörper drei starke Banden auf: eine doppelte Bande bei 70/75 kDa, eine Bande bei 105 kDa, und eine Bande bei 150 kDa. Im Gegensatz dazu zeigte der C-terminalbindende DISC1-Antikörper ein abwechselndes Bandensignal. Er wies nur die 70/75 kDa-Bande nach, sowie eine Bande bei 150 kDa. Die 105 kDa Bande, von welcher angenommen wird, dass sie das vollständig translatierte DISC1-Produkt darstellt (Ishizuka et al. 2006), fehlte in allen untersuchten Proben.

Die Untersuchung mittels Western-Blot zeigte mit beiden verwendeten Antikörpern, dass DISC1 bereits ab Embryonaltag E12 nachweisbar ist. Der Vergleich der Bandenintensität mit dem verwendeten Aktin-Standard macht deutlich, dass das Signal der 150 kDa-Bande

während der Entwicklung zunimmt und sein Maximum an P12 erreicht. Es bleibt auch danach auf einem sehr hohen Expressionsniveau. Das nur vom N-Terminus markierenden DISC1 Antikörper gezeigte Signal bei 105 kDa ist am stärksten während der späten Phasen der Embryonalentwicklung und der frühen postnatalen Gehirnentwicklung. In späten Phasen der Entwicklung ist hier kaum ein Nachweis möglich. Im Gegensatz zu den 150 kDa und 105 kDa Banden wird das Signal bei 75 kDa während der Entwicklung nicht unterschiedlich stark reguliert. Seine Bandenintensität ist über den Probenzeitraum gleichbleibend.

4.3.2 Immunhistochemische Analyse von DISC1 im sich entwickelnden Mausgehirn

Um die Expressionsmuster von DISC1 in der Embryonalentwicklung des Gehirns genauer zu analysieren, wurden immunhistochemische Färbungen mit den beiden DISC1-Antikörpern an Schnitten von embryonalen Mäusegehirnen durchgeführt. Die Versuchsreihe begann am Embryonaltag E12 und endete am Tag der Geburt (P0) mit den am weitesten entwickelten Gehirnen. Wie bereits im Kapitel 4.2 gezeigt, führen die beiden Antikörper, bis auf wenige Ausnahmen, bei Markierungen am adulten Gehirn zu gleichen Ergebnissen. Allerdings zeigen sie erhebliche Unterschiede zwischen C- und N-terminalbindendem DISC1-Antikörper im Färbeverhalten bei embryonalen und frühen postnatalen Gehirnen, wie den Abbildungen 10 – 12 zu entnehmen ist.

Am Embryonaltag E12, dem frühesten untersuchten Stadium, werden hauptsächlich die Neurone gebildet, welche die Marginalzone und die subplate bilden. Hier wurden nur einige wenige Zellen des entstehenden Kortex und der medialen ganglionischen Eminenz (MGE) durch den N-terminalbindenden DISC1-Antikörper markiert. Der Antikörper für den C-Terminus des Proteins zeigte in diesem Stadium ein sehr starkes Signal. Besonders die Zellen der radialen Glia des Kortex und der MGE wurden von ihm markiert, blieben aber vom N-Terminus markierenden Antikörper vollkommen ungefärbt (Abbildung 10A).

Zwei Tage später, am Embryonaltag E14, ist das Gehirn weiter ausdifferenziert. Die sich bildende kortikale Platte, aus welcher später unter anderem die graue Substanz des Neokortex hervorgeht, trennt die Marginalzone von der subplate. In diesem Entwicklungsstadium kommt es zu einem wesentlich stärkeren Signal des N-terminalbindenden DISC1-Antikörper, im Vergleich zu dem Signal am Embryonaltag E12. Er markiert die Zellen des sich entwickelnden Kortex sehr stark und hier im Besonderen die der kortikalen Platte. Weiterhin weist er DISC1 auch in einzelnen Zellen der Marginalzone sowie in Zellen der subplate nach.

Durch die Verwendung dieses Antikörpers kann DISC1 auch in Zellen des sich entwickelnden Striatums und der MGE an E14 nachgewiesen werden. In diesen beiden Regionen ist sein Signal allerdings weniger stark ausgeprägt als in der kortikalen Platte (Abbildung 10B).

Im Gegensatz dazu zeigte der C-terminalbindende DISC1-Antikörper auch am Embryonaltag E14 ein sehr verschiedenes Expressionsmuster des Proteins. Sein Signal fand sich hauptsächlich in den Zellen der radialen Glia des Kortex, wie dies auch schon an Embryonaltag E12 der Fall war. Weiterhin war es durch seine Verwendung möglich, DISC1 in Fasern des entstehenden Striatums nachzuweisen. In der MGE konnte mittels dieses Antikörpers DISC1 vorrangig in den Zellen der ventrikulären Zone nachgewiesen werden. Das zelluläre Signal nahm hier im Verlauf der intermediären Zone sukzessive ab und beschränkte sich hier auf die Fasern (Abbildung 10B). Wie im Kapitel 4.4 gezeigt werden wird, kann mit dem C-terminalbindenden Antikörper DISC1 in verschiedenen Fasertrakten des sich entwickelnden embryonalen Zentralnervensystem nachgewiesen werden.

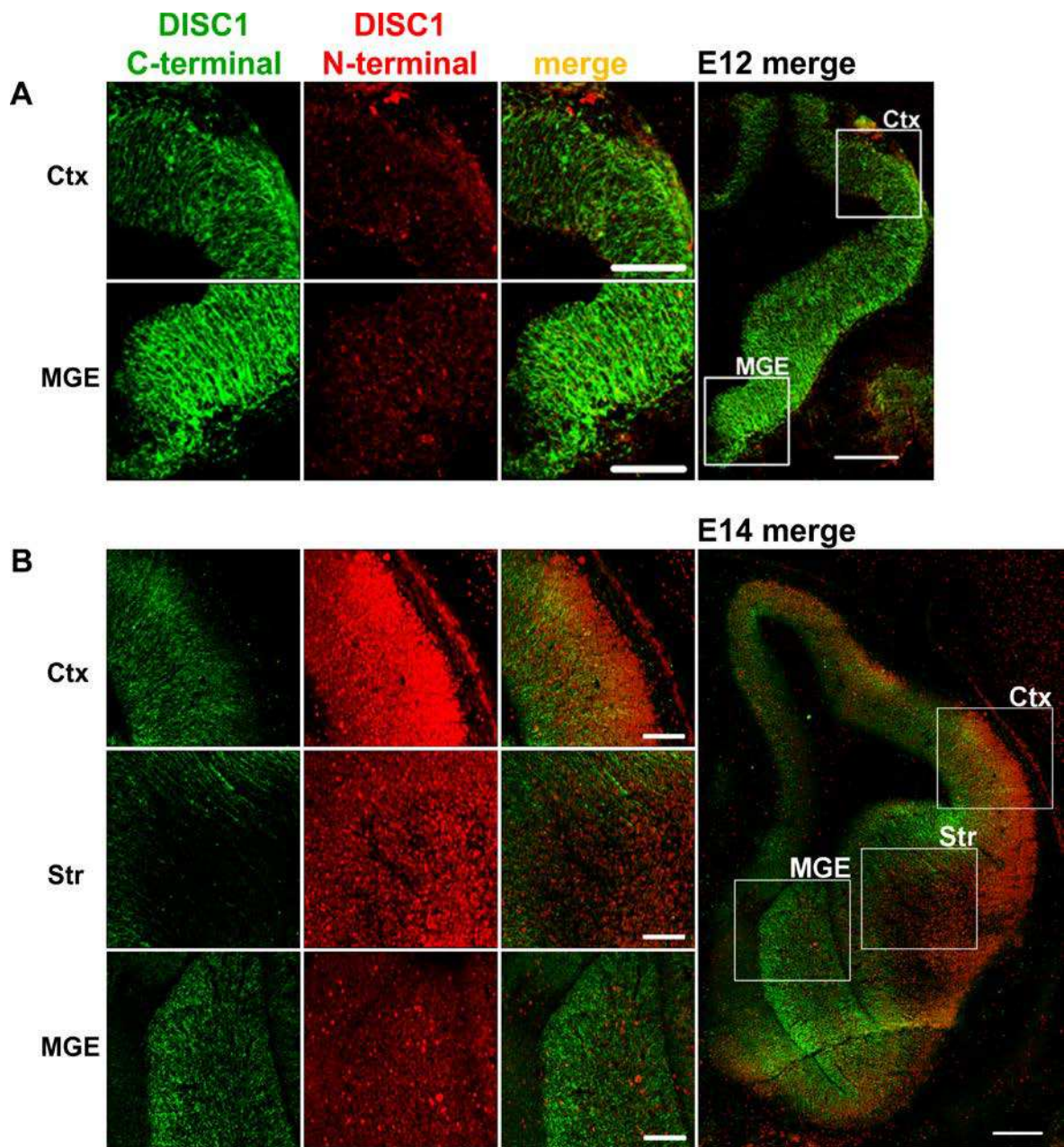


Abbildung 10 Konfokalmikroskopie des embryonalen Mausgehirns an E12 und E14

Immunhistochemische Doppelmarkierung von DISC1 mittels eines C- und eines N-terminalbindenden Antikörpers. Schnitte in der Koronarebene von Mausgehirnen an den Embryontagen E12 (A) und E14 (B). (A) Besonders vergrößert wurden zwei Ausschnitte, einer im sich entwickelnden Kortex (Ctx) und einer in der medialen ganglionischen Eminenz (MGE). Im Gegensatz zum N-terminalbindenden Antikörper markiert der C-terminalbindende DISC1 besonders stark in der radialen Glia. DISC1 in den Zellsomata ist in diesem Entwicklungsstadium kaum markiert. (B) Am Embryontag E14 wurde zusätzlich zum Kortex (Ctx) und der medialen ganglionischen Eminenz (MGE) noch das Striatum (Str) untersucht. Die Markierungen von DISC1 durch die beiden verwendeten Antikörper unterschieden sich auch in diesem Stadium stark voneinander. Der C-terminalbindende Antikörper markierte die radiale Glia, Fasern des Striatums und Zellsomata der ventrikulären Zone. Der N-terminalbindende Antikörper markierte Zellsomata im Striatum, der medialen ganglionischen Eminenz und besonders stark in der kortikalen Platte. Die Maßbalken entsprechen 50 μ m.

Am Embryonaltag E16 kommt es zu einer Verschiebung des Expressionsmusters von DISC1. Der den N-Terminus des Proteins markierende Antikörper wies DISC1 in der kortikalen Platte nach. Durch die immunhistochemischen Markierungen unter der Verwendung beider DISC1-Antikörper konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der Zellen des Striatums zu diesem Zeitpunkt DISC1 exprimieren. Dieser Nachweis erfolgte besonders durch das zelluläre Signal des N-terminalbindenden Antikörpers. Durch ihn konnte auch belegt werden, dass, im Gegensatz zum Embryonaltag E14, an E16 nur noch vereinzelte Zellen in der MGE DISC1 exprimieren.

Zu diesem Zeitpunkt wurde DISC1 auch in einzelnen kortikalen Zellen durch den C-Terminus markierenden Antikörper dargestellt. Hier überwog das Signal in markierter radialer Glia. Zu diesem Zeitpunkt konnte DISC1 im Striatum mittels dieses Antikörpers nicht in den Zellsomata nachgewiesen werden, allerdings weiterhin in einzelnen Fasern. Das Markierungsverhalten der MGE am Embryonaltag E16 entsprach dem von E14, so dass das Vorhandensein von DISC1 in Zellen der ventrikulären und Fasern der intermediären Zone bestätigt werden konnte. Gerade in diesem Entwicklungsstadium konnte durch den C-terminalbindenden Antikörper DISC1 in einigen zusätzlichen Fasertrakten gefunden werden, wie in der Abbildung 11A gezeigt wird. Dieses Markierungsverhalten wird im Kapitel 4.4 ausführlicher erörtert.

Am Embryonaltag E18, dem nächsten untersuchten Stadium, konnte eine starke Expression von DISC1 mittels N-terminalbindender Antikörper in den Zellen der kortikalen Platte nachgewiesen werden; hier besonders in den Zellen der oberen kortikalen Schichten und weniger in den Zellen der Schichten IV – VI oder der subplate. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten, die DISC1 in diesem Entwicklungsstadium auch in anderen Regionen des Kortex nachgewiesen hatten (Austin et al. 2004), konnte der C-Terminus markierende Antikörper weder DISC1 in Zellen des Striatums, des basalen Telencephalons oder der intermediären Zone nachweisen (Abbildung 11B).

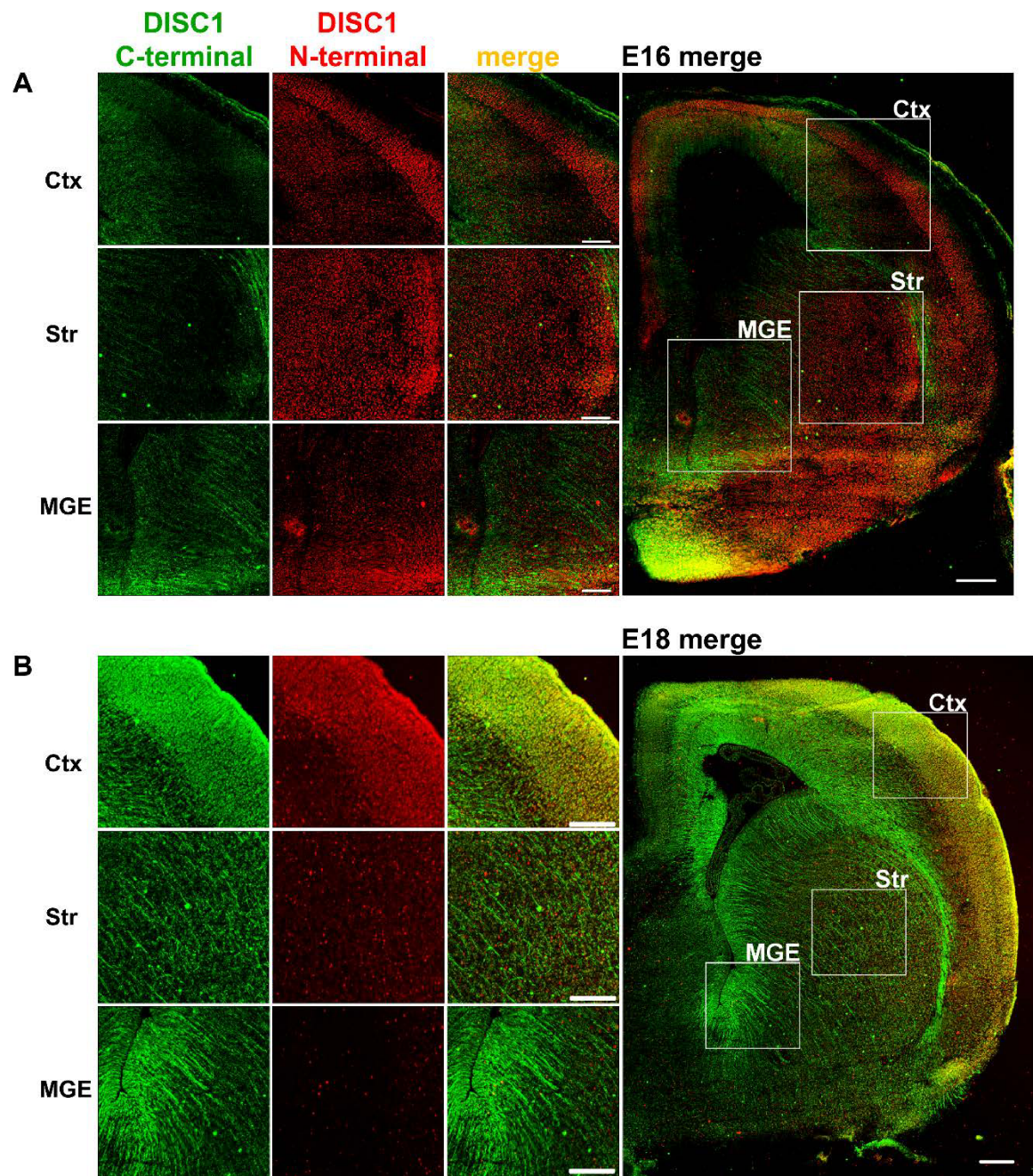


Abbildung 11 Konfokalmikroskopie des embryonalen Mausgehirns an E16 und E18

Immunhistochemische Doppelmarkierung von DISC1 mittels eines C- und eines N-terminalbindenden Antikörpers. Schnitte in der Koronarebene von Mausgehirnen an den Embryonaltagen E16 (A) und E18 (B). (A) In diesem Entwicklungsstadium wurden keine Unterschiede zu E14 im DISC1-Expressionsmuster innerhalb der medialen ganglionischen Eminenz (MGE) gefunden. Allerdings markierte der N-terminalbindende Antikörper besonders viele Zellsomata innerhalb des Striatums (Str) und der kortikalen Platte (Ctx). Im Gegensatz zum Signal des N-terminalbindenden Antikörpers wies die Markierung durch den C-terminalbindenden DISC1-Antikörper nur ein schwaches Signal in Zellsomata des Kortex auf; seine Markierungen beschränkten sich weiterhin größtenteils auf Fasern. (B) Am Embryonaltag E18 wurde eine besonders starke Markierung von DISC1 in den oberen Schichten der kortikalen Platte mittels des N-terminalbindenden Antikörpers detektiert (Ctx). Das basale Telencephalon (MGE) und das Striatum (Str) wiesen kein N-terminal markiertes DISC1 auf. In diesem Entwicklungsstadium wurde DISC1 in Zellsomata der kortikalen Platte mittels C-terminalbindende Antikörper markiert (Ctx). Weiterhin konnte der Antikörper das DISC1 in den Axonen der MGE sowie der weißen Substanz nachweisen. Die Maßbalken entsprechen 50 µm.

Von diesem Entwicklungsstadium an wurde auch DISC1 in den Zellsomata der kortikalen Platte mittels des C-terminalbindenden Antikörpers markiert. Dies geschah in derselben Weise wie die Markierung des N-terminalbindenden DISC1-Antikörpers. Die Signale beider verwendeten Antikörper waren in diesen Zellen kolokalisiert. Weiterhin wurden durch diesen Antikörper die auswachsenden Axone aus der MGE markiert und es gab auch ein positives Signal in den Fasern der sich bildenden weißen Substanz, wie Abbildung 11B zeigt.

Am Tag der Geburt (P0) wurde, im Gegensatz zu früheren Arbeiten (Austin et al. 2004), DISC1 in allen Schichten des Kortex vom N-terminalbindenden Antikörper nachgewiesen. Auch der C-Terminus markierende Antikörper lieferte hier ein positives Signal. Allerdings war dieses wesentlich kräftiger in den Schichten II – III ausgeprägt. In den tieferen Schichten des Kortex waren, im Vergleich zum N-terminalbindenden Antikörper, wesentlich weniger Zellen durch diesen Antikörper markiert. Die meisten Fasern und Trakte, welche bis zum Embryonaltag E18 noch durch den C-terminalbindenden DISC1-Antikörper erkannt wurden, waren nun nicht mehr dadurch nachweisbar. Wie die Abbildung 12 zeigt, wiesen lediglich die Fasern der weißen Substanz noch ein DISC1-Signal auf.

An P0 konnte in allen untersuchten Tieren ein kräftiges Signal von DISC1 in den Zellen des Hippocampus nachgewiesen werden, welches dem Signal von adulten Tieren entsprach. Das Signal durch den verwendeten DISC1-Antikörper für den N-Terminus des Proteins war kräftiger als das Signal, welches durch den C-terminalbindenden Antikörper erzeugt wurde. Unabhängig davon waren die beiden Signale kolokalisiert.

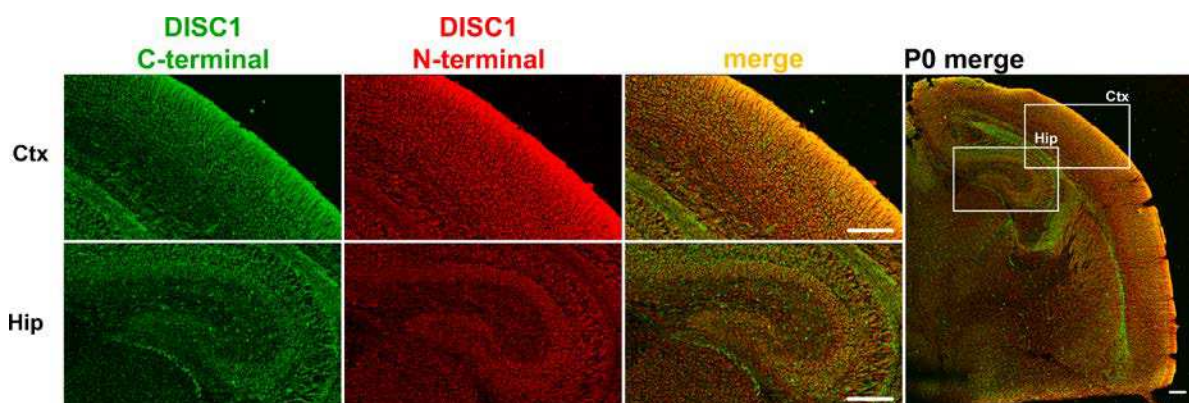


Abbildung 12 Konfokalmikroskopie des Mausgehirns an P0

Immunhistochemische Doppelmarkierung von DISC1 mittels eines C- und eines N-terminalbindenden Antikörpers. Schnitte in der Koronarebene eines Mausgehirns am Tag der Geburt P0. Die beiden verwendeten Antikörper gegen DISC1 waren beide in der Lage das Protein in den Zellen aller Schichten des Kortex zu markieren, wobei das Signal, welches der C-terminalbindende Antikörper lieferte, in den Schichten II – III stärker als in den tieferen Schichten ausgeprägt war. Weiterhin konnte kein DISC1 in den Fasern nachgewiesen werden (Ctx). Die Signale, welche die beiden Antikörper im Hippocampus (Hip) während des Entwicklungsstadiums P0 zeigten, entsprachen dem von adulten Tieren. Die Maßbalken entsprechen 50 µm.

4.4 Die Markierung von speziellen Fasertrakten im sich entwickelnden Gehirn durch den C-terminalbindenden DISC1-Antikörper

Eine frühere Arbeit konnte bereits zeigen, dass DISC1 während der Embryonalentwicklung im Corpus callosum (CC) exprimiert wird. Die Gruppe um Osbun wies DISC1 an den Embryonaltagen E14–E17 nach und verwendete hierfür einen polyklonalen DISC1-Antikörper, welcher sich gegen den C-Terminus des Proteins richtete (Osby et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Ergebnisse bestätigt und es konnten darauf aufbauend weitere Erkenntnisse zum Expressionsverhalten von DISC1 im CC gewonnen werden. Der C-terminalbindende Antikörper zeigte eine DISC1-Expression in Axonen des CC über den Embryonaltag E17 hinaus bis zu einem Tag nach der Geburt (P1). Diese Axone wiesen bei den adulten Vergleichstieren allerdings keine DISC1-Expression mehr auf. Das DISC1 Protein verschwindet im Laufe der nachgeburtlichen Entwicklung bis zum adulten Tier vollständig aus dem CC (Abbildung 13A und 13D). Der N-terminalbindende DISC1-Antikörper zeigte bei diesen Axonen des CC weder im embryonalen Stadium noch im adulten eine Immunreaktivität.

Es wurden immunhistochemische Doppelmarkierungen durchgeführt, um zu charakterisieren ob alle bzw. welche Axone die das CC durchlaufen DISC1 exprimieren. Als ein Antikörper diente der C-terminalbindende DISC1-Antikörper. Mit ihm zusammen wurde ein Antikörper gegen das Protein TAG-1 eingesetzt, welches als ein Markerprotein für bestimmte Gruppen von Axonen im sich entwickelnden Gehirn dient (Fukuda et al. 1997, Ohya et al. 2004). Wie in Abbildung 9A gezeigt, sind TAG-1-positive Axone im sich entwickelnden CC vorhanden. Allerdings sind die Signale von DISC1 und TAG-1 zu den untersuchten Zeitpunkten kaum kolokalisiert, wie die Abbildungen 13B und 13C zeigen.

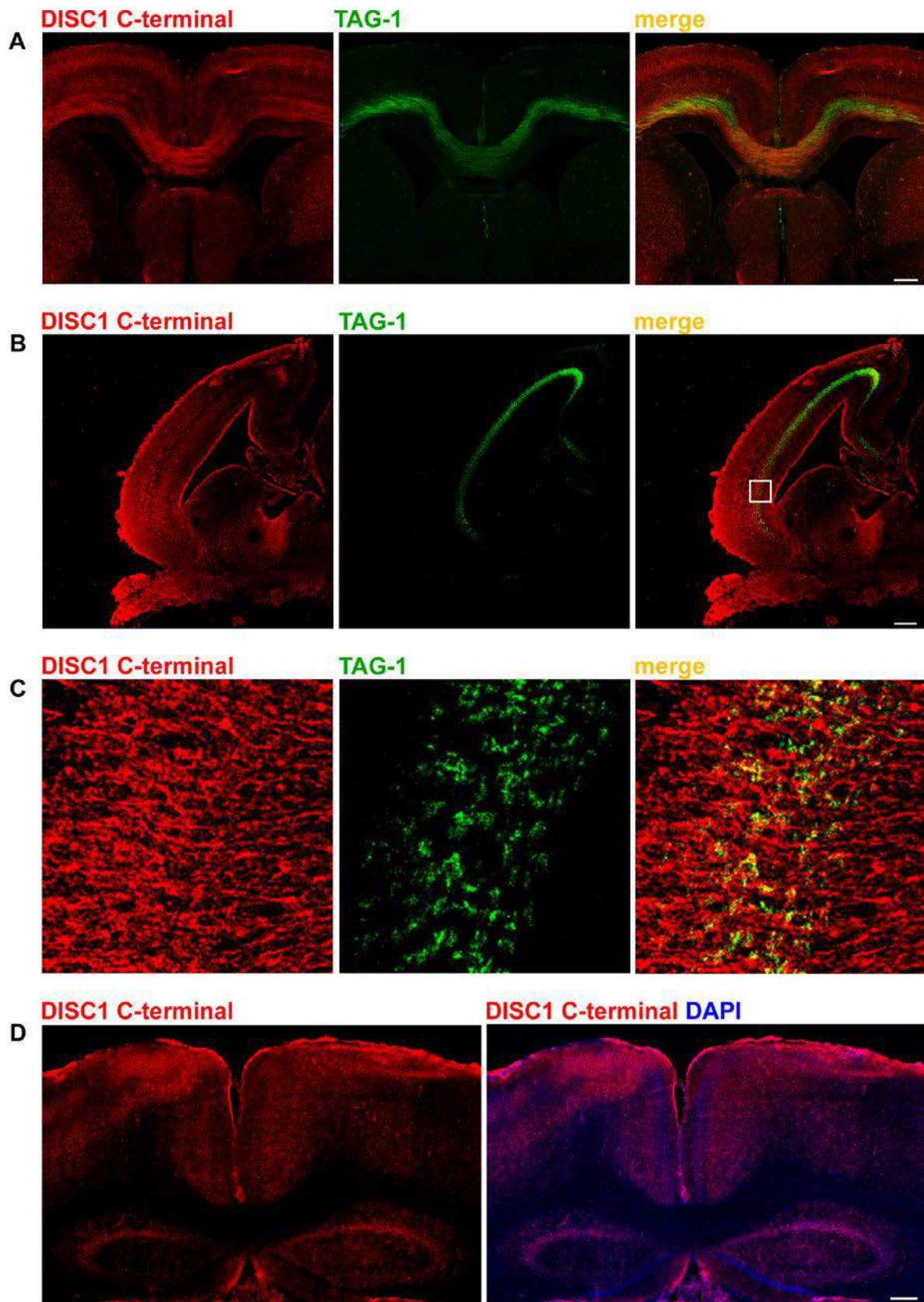


Abbildung 13 Konfokalmikroskopie des embryonalen und adulten Corpus callosum der Maus

Koronarschnitt (A) und Sagittalschnitt (B) des Gehirns mit einer Doppelmarkierung von DISC1 und TAG 1 in Fasern des CCs während des Entwicklungsstadiums E18. (C) Vergrößerung des 50 x 50 µm Quadrats aus (B). Es findet keine Kolokalisation von DISC1 und TAG-1 statt. (D) Koronarschnitt und negative DISC1 Markierung im CC einer adulten Maus. Die Maßbalken entsprechen 50 µm.

Zusätzlich zu den DISC1-positiven Fasern des CC konnte in dieser Arbeit auch der Nachweis von DISC1 in anderen Fasertrakten des sich entwickelnden Gehirns erbracht werden. Mittels des C-terminalbindenden DISC1-Antikörpers konnte das Protein auch im lateralen olfaktorischen Trakt an den Embryontagen E14–E18 detektiert werden (Abbildung 14A). Besonders prominent war in diesem Stadium die Expression von DISC1 in der Retina und dem Nervus opticus (Abbildung 14D).

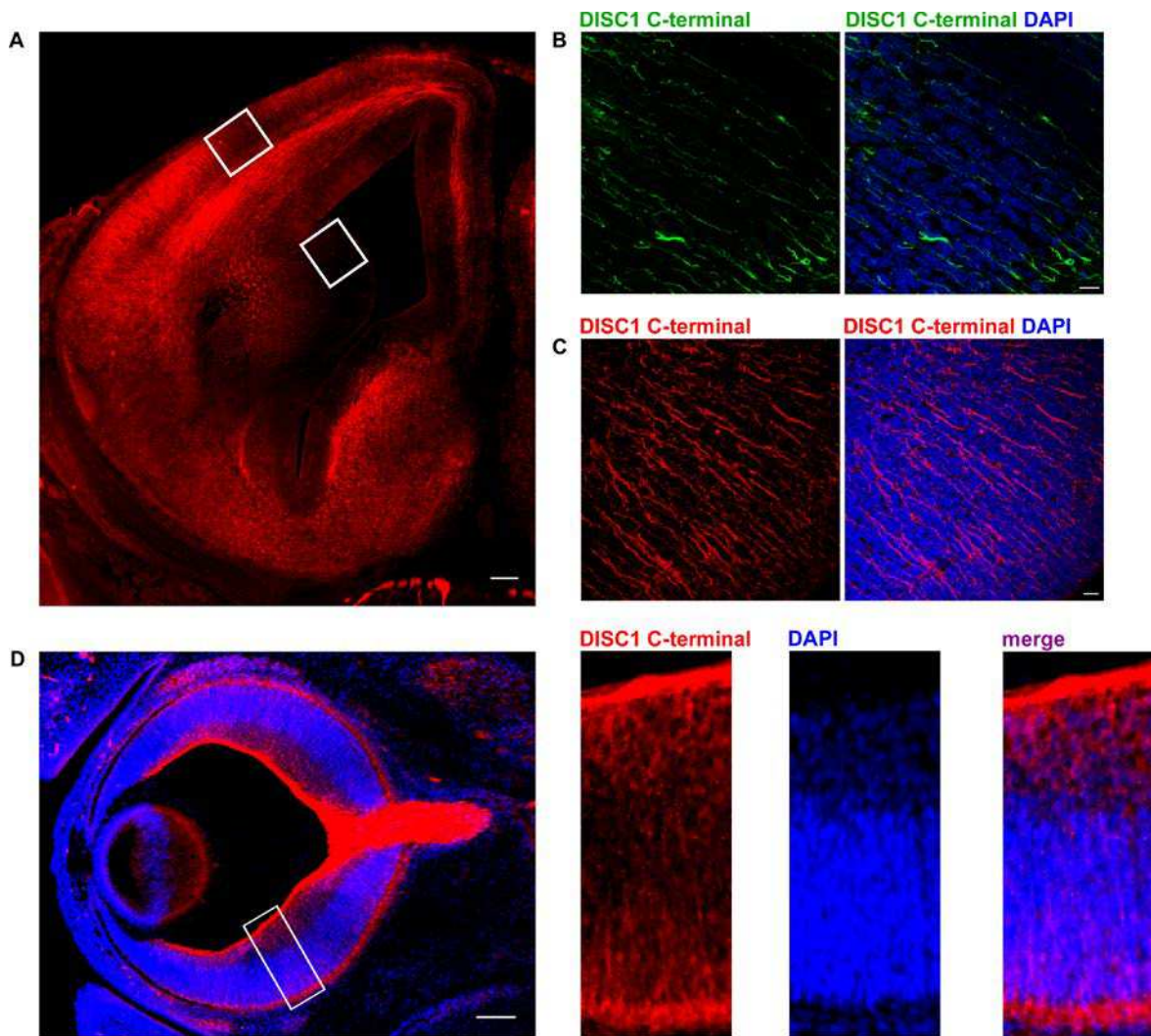


Abbildung 14 Konfokalmikroskopie von Fasern und Trakten im Embryonalstadium E16

(A) Koronarschnitt eines Mausgehirns, DISC1-Markierung mittels C-terminalbindenden Antikörpers. Der Tractus olfactorius sowie Axone des sich entwickelnden Kortex wiesen ein starkes DISC1-Signal auf. (B) entspricht dem weißen Quadrat im Kortex von (A) und zeigt, dass zu diesem Entwicklungszeitpunkt der verwendete Antikörper DISC1 hauptsächlich in den Fasern nachwies. (C) Vergrößerung des weißen Quadrates im basalen Telencephalon von (A). Hier markierte der C-terminalbindende Antikörper überwiegend die auswachsenden Axone. (D) Sagittalschnitt durch ein Auge mit Vergrößerung der entstehenden Retina (weißes Rechteck), DISC1-Markierung mittels C-terminalbindenden Antikörpers. Der verwendete Antikörper markierte den Nervus opticus und einzelne Axone und Zellsomata in der entstehenden Retina, der Großteil der Zellen der Retina zeigte keine DISC1-Markierung. Die Maßbalken entsprechen 50 μm .

Zusätzlich konnte eine sehr hohe DISC1-Expression in Fasern, welche die Capsula interna durchzogen, detektiert werden. An dieser Stelle befindet sich der axonale Signalweg vieler Projektionsneurone zwischen dem Kortex und subkortikalen Regionen. Es ist bekannt, dass kortikothalamische Projektionsneurone, welche durch die Capsula interna ziehen, TAG-1 während ihrer Embryonalentwicklung exprimieren (Fukuda et al. 1997, Ohyama et al. 2004). Wie die Abbildungen 13A – C zeigen, weist die immunhistochemische Untersuchung unter der gleichzeitigen Verwendung des C-terminalbindenden DISC1-Antikörpers und eines TAG-1 markierenden Antikörpers darauf hin, dass Axone welche DISC1 exprimieren über kein TAG-1 verfügen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es sich bei den DISC1 positiven Axonen um afferente thalamokortikale Fasern handelt.

Alle oben gezeigten Ergebnisse von DISC1-positiven Axonen der Projektionsneurone an verschiedenen Stellen des Zentralnervensystems, markiert durch den C-terminalbindenden DISC1-Antikörper, wurden in adulten Tieren nicht gefunden, so dass in keiner dieser Strukturen DISC1 nachgewiesen werden konnte. Dies legt den Schluss nahe, dass zumindest die Nachweisbarkeit von DISC1 mittels immunhistochemischer Markierung auf besondere Weise entwicklungsbiologisch reguliert wird.

4.5 DISC1-Expression in kortikalen Interneuronen mit Ursprung in der MGE

In früheren Arbeiten (Steinecke et al. 2012, Steinecke et al. 2014) konnten Belege dafür geliefert werden, dass DISC1 in Calbindin- und Lhx6-positiven Interneuronen, welche in der MGE gebildet wurden, vorkommt. Hier scheint es einen regulatorischen Einfluss auf die Migration dieser kortikalen Interneuronen zu besitzen. Die vorliegende Arbeit konnte die beiden Vorgängerstudien bestätigen und mit beiden verwendeten DISC1-Antikörpern das Protein während der Migrationsphase der Interneuronen an den Embryonaltagen E14 – E16 nachweisen (Anderson et al. 2001, Wichterle et al. 2001). Weiterhin war es möglich, die subzelluläre Verteilung des DISC1 in den untersuchten Zellen genauer zu analysieren.

Wie im Kapitel 4.2 und dem vorhergehenden Absatz gezeigt, war es mit beiden DISC1-Antikörpern möglich, das Protein in Interneuronen nachzuweisen. Betrachtete man allerdings das subzelluläre Markierungsverhalten, so gab es dort große Unterschiede. Der N-terminalbindende Antikörper wies DISC1 hauptsächlich im Zellkörper nahe dem Zellkern nach, wo er diesen häufig zangenartig umschloss. Darüber hinaus markierte er DISC1 in den

Wachstumskegeln der migrierenden Interneurone. Doppelfärbungen mit dem F-Aktin-Marker Phalloidin zeigten, dass dieses DISC1 noch vor dem Aktinnetz des entsprechenden Wachstumskegels lag (Abbildung 15B).

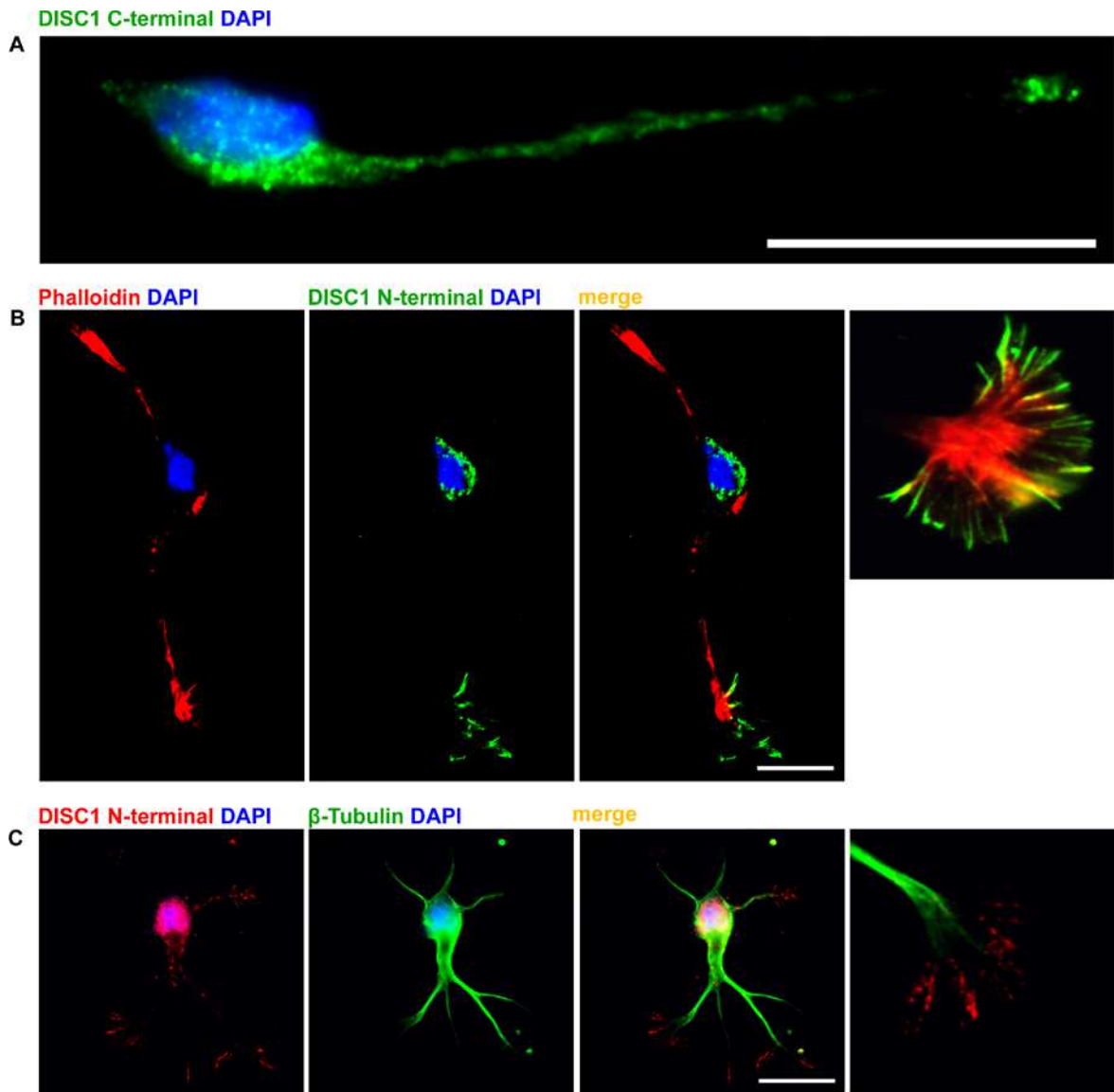


Abbildung 15 Konfokalmikroskopie von isolierten Interneuronen

(A) Immunzytochemische Markierung von DISC1 mittels des C-terminalbindenden Antikörpers. Zu erkennen ist eine punktierte Markierung im Zellsoma, um den Zellkern herum sowie von dort ausgehend in den Führungsfortsatz des Interneurons hinein, bis zur Basis der wachstumskegelartigen Struktur. (B) Immunzytochemische Markierung von DISC1 mittels des N-terminalbindenden Antikörpers an Interneuronen deren F-Aktin durch Phalloidin-Rhodamin eingefärbt wurde. Wie die Abbildung zeigt, befindet sich bei migrierenden Interneuronen F-Aktin hauptsächlich in der Spitze des Führungsfortsatzes, dem nachhängenden Fortsatz und um den Zellkern. DISC1, welches vom N-terminalbindenden Antikörper markiert wird, findet sich noch weiter in den Spitzen des Führungsfortsatzes (siehe vergrößerte wachstumskegelartige Struktur in B) und im Zellsoma, komplett den Zellkern umgebend. (C) Immunzytochemische Doppelmarmierung von DISC1 und β-Tubulin. Das Markierungsmuster des DISC1-Antikörpers entspricht dem in B und ist nicht mit dem des β-Tubulin-Antikörpers kolokalisiert. Die Mikrotubuli erreichen nicht die Spitzen der Fortsätze, in welchen sich DISC1 befindet, sondern füllen das Zellsoma und von dort ausgehend die Führungsfortsätze bis zur Basis der wachstumskegelartigen Spitze aus. Die Maßbalken entsprechen 5 µm.

Im Gegensatz dazu stand das DISC1-Bindeverhalten des C-Terminus markierenden Antikörpers. Dieses führte zu einem punktförmigen Signal im gesamten Zellkörper und im Besonderen im Wachstumsfortsatz der migrierenden Interneurone. In den Spitzen der Wachstumskegel konnte mittels dieses Antikörpers zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung DISC1 nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich in einigen Interneuronen ein DISC1-Signal im Zentrum des Wachstumskegels, was in Abbildung 15A dargestellt ist.

Der genaue molekulare Mechanismus, auf welche Weise DISC1 die neuronale Migration reguliert, ist bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine frühere Arbeit hat allerdings Hinweise darauf gegeben, dass DISC1 das Aktinnetzwerk, welches die Migration der Interneurone ermöglicht, reguliert. Dies wird durch eine Interaktion von DISC1 mit den Proteinen Girdin und Akt ermöglicht (Steinecke et al. 2014). Eine weitere Einflussmöglichkeit von DISC1 auf die Migration der Interneurone kann die Rekrutierung von Proteinen zum Zentrosom sein, welche die Bildung des Dyneinmotorkomplexes zur Folge hat (Kamiya et al. 2005). Als einer der möglichen DISC1-Bindungspartner am Zentrosom gilt Lis1, welcher auch im Verdacht steht, die neuronale Migration zu regulieren. Um diesen Zusammenhang zwischen DISC1, Lis1 und der neuronalen Migration genauer zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zwei Experimente durchgeführt. Es wurden NIH3T3-Fibroblasten mit DISC1-RFP transfiziert, was zu einer Expression von Rot fluoreszierendem DISC1 in den Zellen führte. Hierbei kam es zu einer Konzentration von DISC1 in der Nähe des Zellkerns, wie in Abbildung 15A gezeigt. Um diese Ansammlung roter Fluoreszenz genauer zu charakterisieren, wurden Immun-Doppelmarkierungen mit dem N-terminalbindenden DISC1-Antikörper und einem Antikörper für das Lis1-Protein, an den transfizierten Zellen durchgeführt. Wie in der Abbildung 15B zu sehen, führte dieser Ansatz zu einer exakten Kolo-kalisation zwischen Lis1 und dem transfizierten DISC1-RFP am Zellkern. Allerdings waren die Signale des Lis1-Antikörpers und die des C-terminalbindenden DISC1-Antikörpers zu keinem Zeitpunkt kolo-kalisiert.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die obigen Doppelmarkierungen nun an dissoziierten Zellen der MGE, welche auf einer 2D-Matrix kultiviert wurden, wiederholt. Hierbei konnte eine Kolo-kalisation von Lis1 und DISC1 in einigen dieser Interneurone vor dem Zellkern gezeigt werden. Diese Versuche legen den Schluss nahe, dass die beiden Proteine DISC1 und Lis1 am Zentrosom zusammen lokalisiert sind (Abbildung 16C).

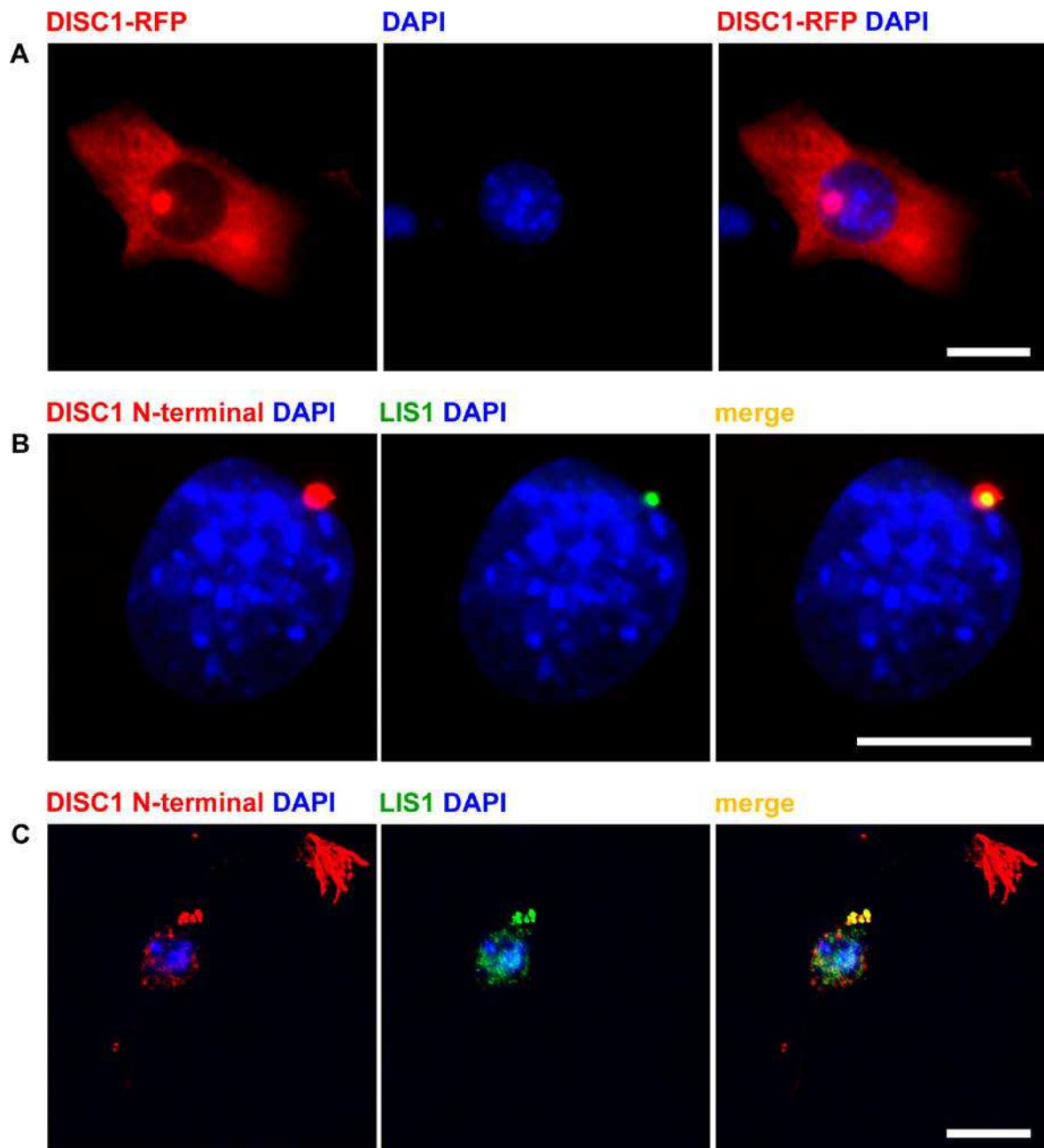


Abbildung 16 Konfokalmikroskopie von NIH3T3 Fibroblasten und Interneuronen

(A) Überexpression von DISC1-RFP in NIH3T3 Fibroblasten. Bei transfizierten Fibroblasten erkennt man eine hohe, kugelförmige DISC1-Konzentration am Zellkern, sowie eine flächige DISC1-Verteilung in der gesamten Zelle, wobei der Zellkern ausgespart bleibt. (B) Immunzytochemische Doppelmarkierung mit N-terminalbindendem DISC1-Antikörper und einem Antikörper gegen Lis1. Der Merge zeigt die Kolokalisation von DISC1 und Lis1 am Zentrosom von Fibroblasten. (C) Immunzytochemische Doppelmarkierung in einem migrierenden Interneuron mit N-terminalbindendem DISC1-Antikörper und einem Antikörper gegen Lis1. Man erkennt eine Kolokalisation von Lis1 und DISC1 am Zentrosom des Interneurons an der Basis des Führungsfortsatzes in Migrationsrichtung vor dem Zellkern. Die Maßbalken entsprechen 5 µm.

5 Diskussion

In einer vorausgehenden Publikation konnten wir bereits zeigen, dass DISC1 einen Einfluss auf tangential migrierende Interneurone hat (Steinecke et al. 2014), indem es unter anderem für die Aktin-Reorganisation und die Bildung von F-Aktin in den Zellfortsätzen essentiell ist. Eine Veränderung in der DISC1-Expression verursacht möglicherweise eine fehlerhafte Migration der betroffenen Neurone, und führt, gerade bei der Gruppe der Interneurone, zu einer gestörten Entwicklung des GABAergen Systems. Dieses für das Gehirn grundlegende System lenkt unter anderem die Weitergabe von Informationen durch Projektionsneurone und synchronisiert deren Aktivität. Eine fehlerhafte Entwicklung in diesem System hat somit auch einen Einfluss auf das Gleichgewicht von Inhibition und Exzitation im Kortex. Bei psychischen Erkrankungen, wie zum Beispiel Schizophrenie, ist gerade diese veränderte Balance einer der möglichen Erklärungsansätze zu ihrer Entstehung. Bei solchen Krankheiten geht man in der Regel davon aus, dass die Voraussetzungen für das Entstehen schon in der Entwicklung des Gehirns geschaffen werden und spätere Einflüsse dann deren Ausbruch hervorrufen (Lewis und Levitt 2002, Marin 2012, Inan et al. 2013).

Unter diesen Vorbetrachtungen wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von DISC1, eines Risikogens für Schizophrenie (Porteous et al. 2006), im sich entwickelnden Mausgehirn untersucht. Dabei wurden zwei Antikörper verwendet, welche an Epitope unterschiedlicher Proteinregionen, einer am N-Terminus und einer am C-Terminus, binden. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur am Embryonaltag E14,5, dem Zeitpunkt an welchem die meisten migrierenden Interneurone gebildet werden (Marin und Rubenstein 2001, Wonders und Anderson 2006), sondern über die gesamte Kortexentwicklung hinweg verschiedene Zelltypen DISC1 exprimierten. Eine mögliche Erklärung, warum während des sich entwickelnden Gehirns die beiden Antikörper unterschiedliche Markierungsmuster von DISC1 lieferten, könnte sein, dass die Epitope, welche von ihnen gebunden werden können, unterschiedlich zugänglich waren. Hierbei gilt es zu berücksichtigen, dass es sich um verschiedene Protein-Varianten, erzeugt durch alternatives Splicing, handeln könnte. Die genaue Anzahl von existierenden Varianten ist bislang ungeklärt (Ishizuka et al. 2007). Weiterhin ist es möglich, dass DISC1 mit ganz unterschiedlichen Proteinen in verschiedenen Typen von Zellen interagiert, denn das DISC1-Interaktom besteht aus einer Vielzahl von möglichen Bindungspartnern (Bradshaw und Porteous 2012). Diese Protein-Protein-

Interaktionen können allerdings auch dazu führen, dass die jeweiligen Epitope von den entsprechenden Antikörpern nicht erreicht werden können, was zu verschiedenen Markierungsmustern führen kann.

5.1 Das Expressionsmuster von DISC1 spiegelt die publizierten Funktionen des Proteins während der kortikalen Entwicklung wider

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass DISC1 während der gesamten kortikalen Entwicklung exprimiert wird. Die verwendeten Antikörper gegen die DISC1-Epitope des N- und C-Terminus führten allerdings zu unterschiedlichen Markierungsmustern. Der N-terminalbindende Antikörper markierte die Somata von neuronalen Zellen des Kortex als auch die der Zellen der ganglionischen Eminenzen. Im Gegensatz dazu markierte, besonders zum Beginn des untersuchten Zeitraums an den Embryonaltagen E12 und E14, der C-terminalbindende Antikörper die Gliazellen. Im Laufe der kortikalen Entwicklung fand hier eine Veränderung statt, so dass gerade bei den untersuchten nachgeburtlichen Stadien hauptsächlich Neurone markiert wurden. Zusätzlich zu den Fasern der Gliazellen konnte der C-terminalbindende Antikörper in verschiedenen Entwicklungsstadien auch DISC1 in den Axonen verschiedener Trakte markieren. Diese Eigenschaft ging allerdings beim adulten Gehirn fast vollständig verloren.

Die Expressionsmuster, welche durch die Markierungen der beiden verwendeten Antikörper in dieser Arbeit dargestellt wurden, stehen im Einklang zu den bis heute publizierten Funktionen, die DISC1 im sich entwickelnden Kortex hat. Schon während der Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen interagiert eine unphosphorylierte Form von DISC1 mit GSK3 β , was zu einer Inhibition der GSK3 β -Aktivität führt. Gezeigt werden konnte dieser Zusammenhang durch eine Herabregulation der DISC1-Expression, welche zu einer verringerten Proliferation der Vorläuferzellen führte, hin zu einem vorzeitigen Verlassen des Zellzyklus und einer frühen Differenzierung der Zellen (Mao et al. 2009). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass schon in den frühen Stadien der kortikalen Entwicklung ein robustes DISC1-Signal an den Orten der proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen vorliegt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass DISC1 auch stark in den radialen Gliazellen vertreten ist. Diese dienen den radial migrierenden Neuronen als Leitstruktur.

In späteren embryonalen Entwicklungsstadien dissoziiert DISC1 von GSK3 β , wodurch die Funktion von DISC1 eine Veränderung erfährt von der Proliferation neuronaler

Vorläuferzellen hin zur Aktivierung der Migration neuronaler Zellen (Ishizuka et al. 2011). Hier konnte gezeigt werden, dass das Signal der DISC1 spezifischen Antikörper sich im Laufe der kortikalen Entwicklung an den Orten der migrierenden Zellen befindet. Besonders im Bereich der MGE lässt sich verfolgen, wie die gebildeten Interneurone tangential auswandern, so dass das DISC1 sukzessive nach dem Höhepunkt der Bildung von Interneuronen am Embryonaltag E14 über die weitere Entwicklung hin abnimmt. Dass die korrekte Expression von DISC1 in den migrierenden Zellen essentiell ist, konnte in mehreren Studien gezeigt werden. Hier spielt sie zum einen eine wichtige Rolle für die radial wandernden kortikalen Projektionsneurone, bei welchen ein DISC1-Knockdown zu einer verminderten Migration führt (Kamiya et al. 2005, Young-Pearse et al. 2010, Kubo et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte DISC1 besonders in den späteren Stadien der embryonalen Entwicklung im Kortex mittels des N-terminalbindenden Antikörpers nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die migrierten Neurone DISC1 exprimierten und dieses nach der abgeschlossenen Migration in den Projektionsneuronen verbleibt. Zum anderen zeigten Studien den Einfluss von DISC1 auf die tangentielle Migration der Interneurone (Steinecke et al. 2012, Steinecke et al. 2014, Lee et al. 2013). Hier konnte gezeigt werden, dass DISC1 an den Orten der Interneuronenentstehung exprimiert wird und darüber hinaus während der embryonalen Kortexentwicklung an den Orten des tangentialen Migrationsstroms. Dies erklärt das Markierungsmuster der Antikörper, welches mit den migrierenden Interneuronen mitwanderte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass DISC1 auch von Zellen des embryonalen Hippocampus exprimiert wird. Hier fanden sich Zellen, in welchen von beiden Antikörpern DISC1 markiert wurde. Im embryonalen Hippocampus findet auch eine Zellmigration statt, bei welcher DISC1 eine wichtige Funktion zu haben scheint (Meyer und Morris 2009, Tomita et al. 2011).

Dass DISC1 auch nach der Proliferation und abgeschlossenen Migration der Neurone weiterhin in kortikalen Neuronen nachgewiesen werden konnte, deckt sich mit der Annahme, dass es eine wichtige Rolle bei der Einbindung von Zellen in das neuronale Netzwerk hat. Durch Zellkulturversuche ist bekannt, dass DISC1 einen Einfluss auf das Ausbilden von Neuriten hat. Die Ergebnisse auf diesem Gebiet sind nicht eindeutig, die Versuche mit PC12-Zellen lieferten unterschiedliche Ergebnisse. Doch postulieren einige Autoren der Studien, dass DISC1 das Auswachsen der Neurite reguliert indem es die Expression von Adhäsionsmolekülen steuert oder aber durch den Einfluss auf Proteine wie das DISC1-bindende Zinkfingerprotein und das Faszikulations- und Elongationsprotein Zeta-1 (Hattori et

al. 2007, Hattori et al. 2010, Kang et al. 2011). Diese Konzepte werden unterstützt durch Versuche, welche zeigten, dass ein verkürztes DISC1-Protein oder das Herunterregulieren der DISC1-Expression durch shRNA das Ausbilden von Neuriten negativ beeinflusst (Ozeki et al. 2003, Kamiya et al. 2005, Kamiya et al. 2006). Die vorliegende Arbeit konnte nun zeigen, dass besonders die radialen Gliazellen während der embryonalen Entwicklung DISC1 exprimieren. Möglicherweise ist DISC1 in diesen Zellen daran beteiligt, die notwendigen Adhäsionsmoleküle für die radiale Migration zu regulieren. Im Laufe der kortikalen Entwicklung nimmt das DISC1-Signal in den Gliazellen ab, bis es im adulten Kortex verschwunden ist. Da hier keine radiale Migration mehr stattfindet, würde auch kein DISC1 mehr benötigt werden, wodurch das Verschwinden des Signals erklärt werden kann. Anzumerken ist, dass nur der Antikörper, welcher das Epitop am C-terminalen Ende des Proteins erkennt, DISC1 nachweisen konnte. Dies wird als Hinweis darauf gedeutet, dass nur ganz bestimmte DISC1-Isoformen die Funktion in den Gliazellen ausführen und diese nicht von allen Antikörpern gegen DISC1 erkannt werden.

Durch die immunhistochemischen Markierungen der embryonalen Entwicklungsstadien des Kortex konnte gezeigt werden, dass das Signal von DISC1-positiven Zellen des sich bildenden Kortex im Laufe der Entwicklung zunimmt. Dieses Ergebnis passt zu der Annahme, dass DISC1 wichtig für die Ausbildung neuronaler Netzwerke im entstehenden Gehirn ist. Je mehr Neurone ihren Zielort nach erfolgreicher Migration erreichen, um so mehr beginnen mit der Ausbildung kortikaler Verschaltungen zwischen den Neuronen. Es konnte sowohl durch den Knockdown von DISC1 als auch die Expression von mutiertem DISC1-Protein gezeigt werden, dass es notwendig ist für einen geregelten Transport von Vesikeln an den Synapsen der Neurone (Flores et al. 2011). Zusätzlich ist DISC1 ein Schlüsselregulator für Teile der postsynaptischen Verdichtung und steuert so die Morphologie und Funktion von Synapsen und Dornenfortsätze in exzitatorischen Neuronen (Wang et al. 2011a, Hayashi-Takagi et al. 2010). Mit dem Fortschreiten der kortikalen Entwicklung lieferten beide verwendeten Antikörper übereinstimmende Markierungsmuster in den Somata der kortikalen Zellen. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass für die Funktionen von DISC1 bei der Ausbildung der neuronalen Netzwerke innerhalb des Kortex andere Isoformen des Proteins tätig sind als in den radialen Gliazellen des Kortex während der Migration.

5.2 DISC1-Expression in den Fasertrakten des embryonalen Gehirn

Bei Versuchen, in welchen Neurone des Hippocampus isoliert und in Zellkultur gebracht wurden, zeigte sich eine Verkürzung der Axone nach dem Verlust von DISC1 in den Zellen (Taya et al. 2007, Shinoda et al. 2007). Dies lässt darauf schließen, dass DISC1 notwendig für eine korrekte Axonentwicklung ist. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Immunhistochemie DISC1 in den unterschiedlichsten Axonen während der kortikalen Entwicklung nachgewiesen werden. Eine Expression von DISC1 in den Axonen des sich entwickelnden Gehirns unterstützt die Annahme von Taya und Shinoda, dass das Protein eine wichtige Rolle bei der korrekten Axonausbildung spielt. In allen sich entwickelnden Axonen, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, konnte DISC1 nur mittels des C-terminalbindenden Antikörpers detektiert werden. Dieser Befund deutet auf zwei Möglichkeiten hin: entweder werden in den sich ausbildenden Axonen nur bestimmte Isoformen von DISC1 exprimiert oder die Epitope, welche der N-terminalbindende Antikörper erkennt, werden in den Axonen durch Protein-Protein-Interaktionen von DISC1-Bindungspartnern verdeckt, so dass dieser Antikörper hier DISC1 nicht markieren kann. Die zweite These erscheint weniger plausibel, da zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung mittels N-terminalbindenden Antikörper DISC1 in Axonen markiert werden konnte. Auch ist es unwahrscheinlich, dass die entsprechenden Epitope in allen Axonen in allen untersuchten Stadien permanent verdeckt sind.

Durch diese Arbeit konnte DISC1-Expression in verschiedenen Trakten des embryonalen Gehirns nachgewiesen werden, darunter in der sich entwickelnden Retina, dem Sehnerv, dem lateralen olfaktorischen Trakt und dem Corpus callosum. Für Letzteres konnte zuvor gezeigt werden, dass DISC1 eine entscheidende Funktion in dessen korrekter Ausbildung während der Entwicklung besitzt (Osburn et al. 2011). Die Rolle von DISC1 in den Axonen scheint allerdings auf die embryonale Entwicklung beschränkt zu sein. In keinem der untersuchten Mausgehirne adulter Tiere wurde DISC1 in den Axonen nachgewiesen.

5.3 DISC1-Expression im Gehirn adulter Mäuse

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, war es mittels der beiden verwendeten Antikörper möglich, das stabile Vorhandensein von DISC1 im adulten Gehirn nachzuweisen. Hierbei wurde DISC1 in Zellen des Kortex über alle sechs Schichten verteilt markiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Zellen des Cerebellums, des Hippocampus und des Bulbus olfactorius DISC1 exprimieren. Für den Hippocampus und den Bulbus olfactorius ist bereits

bekannt, dass hier Neurogenese und neuronale Migration noch im Stadium des Erwachsenseins stattfinden. Zwei Prozesse für die gezeigt werden konnte, dass DISC1 einen Einfluss darauf hat (Siehe Kapitel 1.5.2).

5.3.1 DISC1-Expression im adulten Hippocampus

Gerade der Hippocampus wurde mit Hinblick auf die Expression und Funktion von DISC1 intensiv untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass DISC1 während aller Stadien der Entwicklung exprimiert wird, allerdings wird diese Expression nach der Geburt weiter spezialisiert. So wird DISC1 in den Regionen des Cornu ammonis (CA1 – CA4) um den Geburtszeitpunkt herum am stärksten markiert. Dieses Signal wird allerdings in der weiteren Entwicklung des Hippocampus schwächer. Nur die Region CA3 bildet hier eine Ausnahme, indem sich hier ein starkes Signal von DISC1 positiven Zellen noch bis in das Erwachsenenalter hineinfindet. Im Gegensatz hierzu steht die Expression von DISC1 im Gyrus dentatus: hier findet sich zwar im Mausfötus ein immunhistochemisches Signal der beiden DISC1-spezifischen Antikörper, allerdings ist dieses selbst in frühen nachgeburtlichen Stadien relativ schwach. Bei älteren Tieren ist hier der Ort des stärksten Signals von DISC1, also der stärksten DISC1-Expression, was einen Wandel der DISC1-Expression in der hippocampalen Entwicklung nahelegt. Studien konnten mittels einer Koloalisation von DISC1 und Ki67 zeigen, dass Vorläufer von Körnerzellen, welche zum Gyrus dentatus migrieren, und auch proliferierende Zellen der subgranulären Zone, einem Teil des Gyrus dentatus, DISC1 exprimieren (Austin et al. 2004, Meyer und Morris 2008).

Für andere Regionen des sich entwickelnden Gehirns konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von DISC1 in den Neuronen zu einer verminderten Migration und einer Fehlverschaltung der Zellen führt. Dieses Verhalten tritt auch im embryonalen Hippocampus auf, bei welchem es zu einer verringerten Migration der Körner- und Pyramidenzellen durch den Verlust von DISC1 kommt. Dieser Migrationsdefekt verursacht im ausgereiften Hippocampus eine falsche Platzierung der Neurone, welche eine ungeordnete Ausbildung des apikalen Dendritenbaums zur Folge hat (Meyer und Morris 2009, Tomita et al. 2011). Nach der Geburt führt ein Knockdown von DISC1 im Hippocampus von Mäusen überraschenderweise zu einem entgegengesetzten Effekt. Hierbei migrieren die Zellen weit über ihren Bestimmungsort hinaus, verfügen über hypertrophierte Somata, ein stark vermehrtes Auswachsen von Dendriten und eine übermäßige Ausbildung von Synapsen (Duan et al. 2007, Kim et al. 2009, Zhou et al. 2013). Möglicherweise ist ein DISC1-Bindungspartner, das Protein Girdin, der Schlüssel bei der Regulation der DISC1-Funktionen

im adulten Hippocampus. Allerdings wird seine Rolle im Bezug auf DISC1 kontrovers diskutiert (Enomoto et al. 2009, Kim et al. 2009).

Die Gründe für eine unterschiedliche DISC1-Expression während der Entwicklung und der unterschiedliche Einfluss des Proteins in verschiedenen Stadien der Hippocampalentwicklung sind weiterhin unklar. Eine mögliche Erklärung ist der Einfluss von äußeren, noch unbekannten Faktoren auf DISC1. Solche Einflüsse könnten gezielt und zeitlich begrenzt die Funktionen von DISC1 auf unterschiedliche Weisen beeinflussen (Meyer und Morris 2009).

5.3.2 DISC1-Expression im adulten Bulbus olfactorius

Wie gezeigt, scheint DISC1 einen großen Einfluss auf verschiedene Migrationsströme der Neurone im sich entwickelnden Gehirn zu haben. Umso überraschender ist es, dass DISC1 möglicherweise keinen Einfluss auf die Migration der Neuroblasten im rostralen Migrationsstrom des postnatalen Gehirns besitzt. Auf diesem Weg gelangen auch noch im adulten Gehirn neugebildete Zellen von der subventrikulären Zone zum Bulbus olfactorius. Auf den Migrationsstrom dort wirkt wahrscheinlich Girdin, ein wichtiger Interaktionspartner von DISC1, als ein intrinsischer Regulator für das Zytoskelett während der Migration (Wang et al. 2011b). Allerdings konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass an verschiedenen Stellen des Bulbus olfactorius auch bei adulten Tieren noch eine DISC1-Expression vorhanden ist. Nicht nur in Tufted-Zellen und periglomerulären Interneuronen wurden DISC1 markiert, sondern auch in Mitralzellen der externen plexiformen Schicht. Diese robusten Signale legen den Verdacht nahe, dass DISC1 eine entscheidende Rolle im adulten Bulbus olfactorius spielt. Die Annahme, dass DISC1 für das olfaktorische System von Bedeutung ist, wird durch eine Studie gestützt, welche zeigen konnte, dass bei Schizophrenie-Patienten der Bulbus olfactorius signifikant verkleinert ist. Die Autoren gehen davon aus, dass die strukturellen Veränderungen, welche die Krankheit im Gehirn verursachen, dafür verantwortlich sind (Turetsky et al. 2000). Belege dafür, dass DISC1 einen großen Einfluss auf die Migration während der Entwicklung des Gehirns hat, wurden in vielen neuen Studien gefunden (Kamiya et al. 2005, Duan et al. 2007, Kubo et al. 2010, Young-Pearse et al. 2010, Steinecke et al. 2012, Steinecke et al. 2014).

Die Ergebnisse dieser Arbeit und bereits publizierter Studien zusammengefasst zeigen, dass noch eingehendere Untersuchungen erfolgen müssen, um die Bedeutung des Einflusses von DISC1 auf die Migration von Zellen zum Bulbus olfactorius und dessen adulter Struktur herauszustellen.

5.3.3 DISC1-Expression im adulten Cerebellum

Die vorliegende Arbeit konnte mit beiden verwendeten Antikörpern zeigen, dass DISC1 in verschiedenen Zellen des Cerebellums exprimiert wird. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu einer älteren Studie (Ma et al. 2002), welche DISC1 mittels in-situ-Hybridisierung nur in kleinen, die Purkinje-Zellen umlagernden Zellen nachwies. Die neuen Ergebnisse allerdings zeigen, dass sowohl Purkinje-Zellen selbst, als auch kleinere Zellen der Molekular- und Körnerschicht DISC1 exprimieren und decken sich dabei mit den Ergebnissen einer Studie von Schurkov et al. (2004). Dass sich hier eine andere DISC1-Verteilung als in der Ma et al. Studie zeigte, kann an der Anwendung prinzipiell unterschiedlicher Methoden liegen. Die Gruppe ging davon aus, dass DISC1 im Cerebellum in der Bergmann-Glia vorkommt; zu dieser Annahme konnten allerdings keine Belege gefunden werden. Der Antikörper, welcher während der kortikalen Entwicklung DISC1 in der radialen Glia und den Fasertrakten im sich entwickelnden Kortex markierte, zeigte hier in den Zellen der Bergmann-Glia kein Signal, weder in den Somata noch den Fasern. Um festzustellen, ob die Körner- oder Golgizellen oder beide Zelltypen der Körnerschicht DISC1 exprimieren und welche Zelltypen DISC1 in der Molekularschicht besitzen, sind weitere Studien nötig.

5.3.4 DISC1-Expression im adulten Neokortex

Eine Studie wies durch in-situ-Hybridisierung DISC1 in den Schichten II/III des Neokortex nach (Ma et al. 2002). Eine Studie von Schurov et al. (2004) zeigte unter der Verwendung von immunhistochemischen Markierungen mittels eines Antikörpers gegen DISC1, dass das Protein zusätzlich in den Schichten V/VI vorhanden ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen die Vermutung nahe, dass DISC1 im gesamten Neokortex über alle Schichten hinweg homogen exprimiert wird. Es fand sich bei keinem Versuchstier eine unterschiedliche Markierung in den einzelnen Schichten. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse kann der Einsatz unterschiedlicher Methoden sein. In dieser Arbeit wurde mit zwei Antikörpern gegen entfernt liegende Orte der Aminosäuresequenz des DISC1 Proteins gearbeitet, so konnten möglicherweise verschiedene Isoformen des DISC1-Proteins markiert werden. Dieser Ansatz führte, im Vergleich zu Schurov et al., zu einer scheinbar großflächigeren Verteilung des Proteins innerhalb des Neokortex. Diese Möglichkeit wird gestützt von dem Ergebnis, dass nicht alle DISC1-markierten Zellen von beiden Antikörpern gleichermaßen erkannt wurden.

Durch die Verwendung einer speziellen Mauslinie, in welcher die GABA-produzierenden Interneurone GFP markiert waren, konnte gezeigt werden, dass 50 % der kortikalen

Interneurone DISC1 exprimieren. Das Verhältnis von DISC1-markierten Interneuronen zu unmarkierten entspricht dem gleichen Verhältnis von DISC1-markierten Neuronen zu unmarkierten im Kortex. Das Ergebnis, dass die Hälfte aller Neurone eines adulten Neokortex DISC1 exprimieren, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass DISC1 ein wichtiges Protein im Zentralnervensystem darstellt, und es kann angenommen werden, dass weitere Untersuchungen mit zusätzlichen Methoden den prozentualen Anteil von DISC1-markierten Zellen im Kortex noch steigern.

5.4 Unterschiedliche intrazelluläre Lokalisationen von DISC1 in embryonalen Interneuronen

In der vorliegenden Arbeit wurde die intrazelluläre Verteilung von DISC1 in isolierten Zellen der MGE untersucht. In dieser Region wird während der embryonalen Entwicklung ein Großteil der Interneurone gebildet. Um in den isolierten Zellen ein möglichst großes Spektrum von möglichen DISC1-Isoformen zu detektieren, wurden zwei Antikörper verwendet, welche verschiedene Epitope des Proteins binden.

Durch die Verwendung des N-terminalbindenden Antikörpers konnte DISC1 im Soma der Interneurone und in den Spitzen des Führungsfortsatzes nachgewiesen werden. Allerdings war es hiermit nicht möglich, das Protein im Schaft der Interneurone zu detektieren, was den Anschein erweckte, dass sich hier kein DISC1 befindet. Diese Annahme konnte durch die Ergebnisse, welche mit dem C-terminalbindenden Antikörper erzeugt wurden, widerlegt werden. Durch die Verwendung dieses zweiten Antikörpers konnte DISC1 um den Nucleus, wie schon bei der Verwendung des N-terminalbindenden Antikörpers, nachgewiesen werden. Das Signal erstreckte sich allerdings weit in den Schaft herein, erreichte allerdings nie die Spitzen des Führungsfortsatzes.

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass DISC1 mit verschiedenen Teilen des Zytoskeletts interagiert: dem filamentösen Aktin, welches eine entscheidende Rolle bei der Bildung der Spitzen des Führungsfortsatzes von Interneuronen bildet und den Mikrotubuli, welche für die Ausbildung des Schaftes zwischen Soma und Führungsfortsatz verantwortlich sind. Der mögliche Einfluss von DISC1 auf die Organisation von Aktin als auch auf die der Mikrotubuli wurde in anderen Studien zuvor bereits beschrieben. So konnten wir in einer vorhergehenden Studie zeigen, dass ein Knockdown von DISC1 in den migrierenden Interneuronen, zu einer Reduzierung von filamentösem Aktin in den Spitzen der Führungsfortsätze führt (Steinecke et al. 2014). Die Ursache hierfür scheint eine reduzierte

Konzentration von aktiviertem Girdin, einem direkten Bindungspartner von DISC1, welches Aktinfilamente untereinander verknüpft, zu sein. Dieser Befund weist darauf hin, dass DISC1 einen direkten Einfluss auf die Reorganisation von Aktin in migrierenden Interneuronen hat (Steinecke et al. 2014). Diese Arbeit zeigt, dass der Nachweis von DISC1 in verschiedenen Bereichen der Zellen von der Wahl der Untersuchungsmethode abhängen scheint, denn das DISC1, welches sich für die Reorganisation des Aktins verantwortlich zeigte, konnte nur mittels des N-terminalbindenden Antikörpers nachgewiesen werden. Möglicherweise werden bei der DISC1-Girdin-Interaktion die für die Bindung des C-terminalbindenden Antikörpers nötigen Epitope verdeckt oder die verschiedenen Isoformen von DISC1, welche unterschiedliche Aufgaben in den Zellen erfüllen, sind distinkt innerhalb der Zelle getrennt.

Eine der wichtigsten Zellbestandteile für die Neurogenese und die neuronale Migration ist das Zentrosom (Higginbotham und Gleeson 2007). Dieses besteht aus zwei Zentriolen, welche von einer Proteinmatrix umgeben sind (Nigg und Raff 2009). Die Lage des Zentrosoms und der von ihm ausgehenden Mikrotubuli ist entscheidend für die Verteilung von entwicklungsbestimmenden Faktoren innerhalb der Vorläuferzellen. Diese Verteilung ermöglicht ein Gleichgewicht zwischen den Vorläuferzellen und geborenen Neuronen. Es gibt auch Hinweise darauf, dass das Zentrosom eine wichtige Funktion in der Migration der Neurone spielt (Higginbotham und Gleeson 2007). Untersuchungen an Hefe-Hybrid-Systemen legen die Vermutung nahe, dass DISC1 mit einer Vielzahl von Proteinen der zentrosomalen Matrix interagieren kann, so zum Beispiel mit: NDEL1, einem Protein welches während der Interphase des Zellzyklus an der Mitosespindel bindet (Morris et al. 2003, Brandon et al. 2004) und Lis1, einem wichtigen regulatorischen Protein des Motorproteins Dynein (Brandon et al. 2004, Shinoda et al. 2007). Frühere Studien legen zwei Annahmen nahe: erstens geht man davon aus, dass DISC1 notwendig für die Funktion des Zentrosoms ist und dadurch einen entscheidenden Einfluss auf die Organisation der Mikrotubuli hat (Wang und Brandon 2011). Zweitens wird davon ausgegangen, dass DISC1 auch mit den Mikrotubuli selbst interagieren kann und so den Mikrotubuli-vermittelten Transport beeinflusst und zwar sowohl den anterograden mittels der Interaktion mit Kinesin (Shinoda et al. 2007, Taya et al. 2007), als auch den retrograden durch die Interaktion mit Dynein (Kamiya et al. 2005). Die Ergebnisse dieser Studien führten zu der Annahme, dass es sich bei DISC1 um ein Adapterprotein handelt, welches in der Lage ist, definierte Bindungspartner an die Mikrotubuli-Motorproteine für deren Transport zu binden (Wang und Brandon 2011).

Wie im vorhergehenden Absatz ausgeführt, ist Lis1 ein wichtiger Interaktionspartner von DISC1, welcher durch DISC1 an das Zentrosom transportiert wird (Kamiya et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in NIH3T3 Fibroblasten transfiziertes DISC1 mit Lis1 am Zentrosom kolokalisiert ist. Die Markierung des Zentrosoms war allerdings nur mit dem N-terminalbindenden Antikörper für DISC1 möglich. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass nicht alle DISC1-Isoformen an das Zentrosom rekrutiert werden, sondern die einzelnen Isoformen innerhalb der Zelle unterschiedlich verteilt vorliegen. Die Arbeit zeigt auch, dass sich dieses Markierungsverhalten bei isolierten embryonalen Interneuronen wiederfinden lässt. Auch hier wird DISC1 vom N-terminalbindenden Antikörper mit Lis1 kolokalisiert am Zentrosom nachgewiesen, und zwar in der Schwellung des Führungsfortsatzes vor der Kerntranslokation des migrierenden Interneurons. Durch einen Knockdown von DISC1 kommt es zu Migrationsdefekten bei tangential migrierenden Interneuronen (Steinecke et al. 2014); ähnliche Defekte treten auch bei einem Knockdown von Lis1 auf. Dieser führt zu Migrationsdefiziten bei Projektions- und Interneuronen, verursacht durch eine verringerte Anzahl von Kerntranslokationen, welche zusammen mit übermäßig verlängerten Führungsfortsätzen, die zu wenig verzweigt sind, auftreten (McManus et al. 2004, Nasrallah et al. 2006, Gopal et al. 2010).

Das DISC1, welches durch den N-terminalbindenden Antikörper markiert wurde, war zwar mit Lis1 am Zentrosom kolokalisiert, allerdings nicht mit dem β -Tubulin des Führungsfortsatzes. Weiterhin endete das Signal des Tubulins in den Spitzen des Fortsatzes vor dem Signal für DISC1. Man kann daher annehmen, dass es sich bei dem DISC1, welches vom N-terminalbindenden Antikörper markiert wird, um eine Isoform handelt. Diese könnte wichtig für die Ausbildung des Aktin-Netzwerks in den Spitzen der Führungsfortsätze und nötig für die Rekrutierung von Proteinen zum Zentrosom sein. Allerdings scheint sie keine Rolle bei der Vermittlung von Proteinen an die Motorkomplexe der Mikrotubuli innerhalb des Führungsfortsatzes zu spielen. Die Annahme von verschiedenen DISC1-Isoformen wird durch das Markierungsverhalten des C-terminalbindenden Antikörpers unterstützt, welcher bei embryonalen Interneuronen im gesamten Führungsfortsatz DISC1 markierte, wobei er, genau wie das β -Tubulin, die vordersten Spitzen aussparte. Dieses Muster ähnelt dem, welches in dieser Arbeit in den Zellen der radialen Glia des sich entwickelnden Kortex gefunden wurde. Auch dort wurde in den Fortsätzen der Zellen mittels C-terminalbindender Antikörper DISC1 markiert. Die vorliegende Arbeit untersuchte die Expression von DISC1 im sich entwickelnden und adulten Mäusegehirn. Die Komplexität und Häufigkeit von Interaktionsmöglichkeiten mit anderen Proteinen sowie die Anzahl von DISC1-Isoformen

erschwert das Erstellen eines umfassenden Expressionsmusters. Um einen breiteren Nachweis von DISC1 im Kortex zu erhalten, wurde in dieser Arbeit mit zwei Antikörpern gegen unterschiedliche Epitope des DISC1-Proteins gearbeitet. Die Ergebnisse der Arbeit unterstreichen die umfassende Rolle von DISC1 besonders in der embryonalen Entwicklung und adulten Neurogenese des adulten Gehirns.

6 Zusammenfassung

Das Gen „Disrupted-in-Schizophrenia-1“ (DISC1) wurde 2001 in einer schottischen Familie entdeckt, die eine erhöhte Prävalenz für psychische Erkrankungen wie Autismus, Bipolarität und Schizophrenie aufwies. Das Gen gilt seitdem als Risikofaktor für psychische Erkrankungen; seine Charakterisierung könnte ein besseres Verständnis und neue Therapieansätze ermöglichen. DISC1 kodiert ein Gerüstprotein, welches in neuronalen Zellen vielfältige Funktionen vermittelt wie Proliferation, Migration, Positionierung im neuronalen Verband und Synapsenbildung. Für die komplexe und korrekte Entwicklung des Zentralnervensystems von der frühen Embryonalperiode bis ins Erwachsenenalter spielt DISC1 deshalb vermutlich eine entscheidende Rolle.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von DISC1 während der Entwicklung des Gehirns in der Maus untersucht. Dabei wurde die zeitliche Entwicklung vom jungen Embryo bis zum adulten Organismus mittels molekularbiologischer Methoden (Western Blot, Immunpräzipitation) analysiert. Für die Untersuchung der räumlichen Verteilung von DISC1 während unterschiedlicher Entwicklungsstadien wurden Dünnschnitte immunmarkiert und mit konfokaler Mikroskopie ausgewertet. Zur Darstellung der intrazellulären Verteilung und Funktion wurde fluoreszenzmarkiertes DISC1 in Zellkulturen überexprimiert und immunzytochemisch sowie molekularbiologisch analysiert. Diese Ergebnisse dienen als Grundlage zur immunzytochemischen Untersuchung von DISC1 in kortikalen Interneuronen, da diese Neurone eine wichtige Rolle bei psychischen Erkrankungen wie z.B. Schizophrenie spielen.

Es konnte gezeigt werden, dass sich das räumliche DISC1-Expressionsmuster während der Gehirnentwicklung mehrfach ändert. Durch die Verwendung zweier Antikörper, die unterschiedliche DISC1-Epitope binden, wurde geklärt, dass verschiedene Isoformen des Proteins zeitlich und räumlich getrennt voneinander exprimiert werden. So konnte eine DISC1-Isoform dargestellt werden, die während verschiedenen Entwicklungsphasen in unterschiedlichen Axonen und Fasern vorkam, in adulten Tieren aber nur noch in den Zellsomata. Eine zweite Isoform wurde unabhängig vom Entwicklungsstadium ausschließlich in den Zellsomata nachgewiesen. Durch Western Blot-Technik konnte quantitativ gezeigt werden, dass die Menge von vorhandenem DISC1 beider Isoformen über die Zeit zunahm. DISC1 konnte in Zellen des adulten Bulbus olfactorius, Cerebellum und Neokortex nachgewiesen werden. Im Kortex wurde in der Hälfte aller untersuchten Neurone DISC1

detektiert, sowohl in Projektions- als auch Interneuronen. Bei Überexpression bildeten sich in Zellkulturen DISC1-Aggresomen. Am Zentrosom war DISC1 dabei kolokalisiert mit Lis1, ein Befund, der für Interneurone bestätigt werden konnte. Für Interneurone, welche tangential migrieren, um ihren Zielort zu erreichen, konnte gezeigt werden, dass DISC1 mit verschiedenen Komponenten des Zytoskeletts kolokalisiert vorliegt. Da die intrazelluläre Verteilung der einzelnen Isoformen aber sehr unterschiedlich war, liegt die Vermutung nahe, dass verschiedene DISC1-Isoformen unterschiedliche Funktionen haben.

Die in dieser Arbeit gezeigten DISC1-Expressionsmuster im embryonalen Neokortex der Maus und deren Entwicklung über die Zeit stützen die Annahme, dass zur Manifestation der Schizophrenie entwicklungsbiologische Faktoren entscheidend beitragen. Der Nachweis von DISC1 am Embryonaltag E12 bis ins späte adulte Stadium der Versuchstiere hinein, ist ein starker Hinweis darauf, dass der Grundstein für Schizophrenie schon früh in der Embryogenese gelegt wird und diese Entwicklung lebenslang eine wichtige Rolle spielt. Der Nachweis von DISC1 in verschiedenen Bereichen des Zentralnervensystems belegt die Wichtigkeit einer genaueren Analyse von molekularen Faktoren, die zu psychischen Erkrankungen führen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass DISC1 möglicherweise einen Einfluss auf die korrekte Entwicklung des Corpus callosum hat, da es dort in späten Embryonalstadien, nicht aber in adulten Tieren detektiert wurde. Ähnliche Veränderungen des Corpus callosum wurden auch für Schizophrenie-Patienten berichtet. Die vorliegende Arbeit zeigt weiterhin, dass während der Migration innerhalb einer Subpopulation von Neuronen, verschiedene Isoformen von DISC1 intrazellulär unterschiedlich verteilt vorliegen. Dies legt die Annahme nahe, dass DISC1 sehr heterogene Aufgaben in den Zellen wahrnimmt.

Die Ergebnisse dieser Dissertation stützen die Annahme, dass die Basis für Erkrankungen des Schizophreniespektrums früh in der Entwicklung des Organismus gelegt wird. Weiterhin unterstützt die vorliegende Arbeit die Vermutung, dass das DISC1-Gen, dessen mannigfaltige Funktionen von unterschiedlichen Isoformen ermöglicht werden, eine relevante Rolle in vielen Teilen des Zentralnervensystems spielt und damit einen Risikofaktor für psychische Erkrankung darstellt.

7 Summary

The gene Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC1) was discovered within the members of a Scottish family in 2001, who had an increased predisposition for mental diseases such as autism, bipolar disorder and schizophrenia. Since then the gene has been known as a risk factor for mental disorders; its characterization might lead to an improved understanding and new therapeutic approaches. DISC1 codes a scaffold protein, which is involved in a diversity of functions in neuronal cells such as proliferation, migration, positioning and the formation of synapses. Thus, DISC1 is probably of very importance for the complex development of the central nervous system from early embryonic stages up to the adult organism.

In the present study the expression of DISC1 in the developing brain of mice was investigated. The development from the early embryo to the adult organism was analyzed using molecular biological methods like western blot and immunoprecipitation. Thin sections of the brain were marked with antibodies against DISC1 and analyzed using confocal microscopy to locate the protein through different developmental stages. To examine the intracellular distribution and functions, a fluorescently labeled DISC1 was over expressed in cell cultures. The results are the basis to analyze DISC1 in cortical interneurons, which are important targets for mental diseases like schizophrenia.

It has been revealed that throughout the brain development the spatial DISC1 expression patterns change several times. Using two antibodies that recognized different DISC1 epitopes it was possible to detect different isoforms of the protein, which were expressed by time and space. It was examined that one DISC1 isoform was present in the axons and fibers throughout several developmental stages, where in adult animals it was found in the cell bodies only. Using quantitative western blot technique, it was verified that the amount of the two DISC1 isoforms increases over time. DISC1 was found to be present in cells of the olfactory bulb, cerebellum, and neocortex. DISC1 was detected in half of the cortical neurons, both projection neurons and interneurons. DISC1 over expression in cell cultures led to aggresome formation of the protein. DISC1 was colocalized with Lis1 at the centrosome, a finding that was confirmed for interneurons. For these cells, which reach their destination through tangential migration, it was shown, that DISC1 is colocalized with various components of the cytoskeleton. As the intracellular distribution of the isoforms was highly diverse, it can be assumed, that DISC1 isoforms differ in function.

The DISC1 expression pattern in the neocortex of mice and their development shown in the present study support the hypothesis that biological factors play an important role in the onset of schizophrenia. The proof of DISC1 expression at embryonic day E12 till late adult stages of the animals is a strong evidence that the cornerstone for schizophrenia is placed early in embryogenesis and plays an important role the whole life time. The proof of DISC1 in different parts of the central nervous system underlines the importance of a deeper analysis of molecular factors, which lead to mental diseases. The present study suggests that DISC1 affects the correct development of the corpus callosum, where it is present at late embryonic stages, but not in adult animals anymore. Similar changes of the corpus callosum have been found in schizophrenic patients. In addition, the present study shows that throughout the migration of a subpopulation of neurons various isoforms of DISC1 are intracellularly separated. This finding confirms the theory that DISC1 has very heterogeneous functions in cells.

The results of this investigation support the assumption that the basis for the schizophrenia disease is placed early in the development of the organism. Furthermore, the present study supports the idea that the DISC1 gene, which plenty of functions are enabled by its different isoforms, plays an important part in many areas of the central nervous system and, thus, is a risk factor for mental diseases.

8 Referenzen

- Akbarian S, Kim JJ, Potkin SG, Hagman JO, Tafazzoli A, Bunney WE, Jr., Jones EG. 1995. Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry*, 52 (4):258-266.
- Anderson SA, Volk DW, Lewis DA. 1996. Increased density of microtubule associated protein 2-immunoreactive neurons in the prefrontal white matter of schizophrenic subjects. *Schizophr Res*, 19 (2-3):111-119.
- Anderson SA, Marin O, Horn C, Jennings K, Rubenstein JL. 2001. Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development*, 128 (3):353-363.
- Atkin T, Kittler J. 2012. DISC1 and the aggresome: a disruption to cellular function? *Autophagy*, 8 (5):851-852.
- Austin CP, Ky B, Ma L, Morris JA, Shughrue PJ. 2004. Expression of Disrupted-In-Schizophrenia-1, a schizophrenia-associated gene, is prominent in the mouse hippocampus throughout brain development. *Neuroscience*, 124 (1):3-10.
- Ayala R, Shu T, Tsai LH. 2007. Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell*, 128 (1):29-43.
- Bellion A, Baudoin JP, Alvarez C, Bornens M, Metin C. 2005. Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J Neurosci*, 25 (24):5691-5699.
- Bielas S, Higginbotham H, Koizumi H, Tanaka T, Gleeson JG. 2004. Cortical neuronal migration mutants suggest separate but intersecting pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20:593-618.
- Blackwood DH, Visscher PM, Muir WJ. 2001. Genetic studies of bipolar affective disorder in large families. *Br J Psychiatry*, 178 (Suppl 41):S134-136.
- Bolz J, Gilbert CD. 1986. Generation of end-inhibition in the visual cortex via interlaminar connections. *Nature*, 320 (6060):362-365.
- Bolz J, Gilbert CD. 1989. The Role of Horizontal Connections in Generating Long Receptive Fields in the Cat Visual Cortex. *Eur J Neurosci*, 1 (3):263-268.
- Bord L, Wheeler J, Paek M, Saleh M, Lyons-Warren A, Ross CA, Sawamura N, Sawa A. 2006. Primate disrupted-in-schizophrenia-1 (DISC1): high divergence of a gene for major mental illnesses in recent evolutionary history. *Neurosci Res*, 56 (3):286-293.

Bradshaw NJ, Porteous DJ. 2012. DISC1-binding proteins in neural development, signalling and schizophrenia. *Neuropharmacology*, 62 (3):1230-1241.

- Bradshaw NJ, Soares DC, Carlyle BC, Ogawa F, Davidson-Smith H, Christie S, Mackie S, Thomson PA, Porteous DJ, Millar JK. 2011. PKA phosphorylation of NDE1 is DISC1/PDE4 dependent and modulates its interaction with LIS1 and NDEL1. *J Neurosci*, 31 (24):9043-9054.
- Brandon NJ, Schurov I, Camargo LM, Handford EJ, Duran-Jimeniz B, Hunt P, Millar JK, Porteous DJ, Shearman MS, Whiting PJ. 2005. Subcellular targeting of DISC1 is dependent on a domain independent from the Nudel binding site. *Mol Cell Neurosci*, 28 (4):613-624.
- Brandon NJ, Handford EJ, Schurov I, Rain JC, Pelling M, Duran-Jimeniz B, Camargo LM, Oliver KR, Beher D, Shearman MS, Whiting PJ. 2004. Disrupted in Schizophrenia 1 and Nudel form a neurodevelopmentally regulated protein complex: implications for schizophrenia and other major neurological disorders. *Mol Cell Neurosci*, 25 (1):42-55.
- Bright JN, Woolf TB, Hoh JH. 2001. Predicting properties of intrinsically unstructured proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, 76 (3):131-173.
- Brodmann K. 1909. Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues von Dr. K. Brodmann. J.A. Barth.
- Camargo LM, Collura V, Rain JC, Mizuguchi K, Hermjakob H, Kerrien S, Bonnert TP, Whiting PJ, Brandon NJ. 2007. Disrupted in Schizophrenia 1 Interactome: evidence for the close connectivity of risk genes and a potential synaptic basis for schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 12 (1):74-86.
- Cardin JA, Carlen M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, Tsai LH, Moore CI. 2009. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature*, 459 (7247):663-667.
- Caviness VS, Jr., Takahashi T. 1995. Proliferative events in the cerebral ventricular zone. *Brain Dev*, 17 (3):159-163.
- Chubb JE, Bradshaw NJ, Soares DC, Porteous DJ, Millar JK. 2008. The DISC locus in psychiatric illness. *Mol Psychiatry*, 13 (1):36-64.
- Daskalakis ZJ, Fitzgerald PB, Christensen BK. 2007. The role of cortical inhibition in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Brain Res Rev*, 56 (2):427-442.
- Davison GC, Neale JM. 1996. Schizophrenie. In: *Klinische Psychologie*. 4. Auflage. Beltz Psychologie Verlags Union, Weinheim, S. 448-485.
- De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F. 1996. Early olfactory fiber projections and cell migration into the rat telencephalon. *Int J Dev Neurosci*, 14 (7-8):853-866.

- DeFelipe J, Lopez-Cruz PL, Benavides-Piccione R, Bielza C, Larranaga P, Anderson S, Burkhalter A, Cauli B, Fairen A, Feldmeyer D, Fishell G, Fitzpatrick D, Freund TF, Gonzalez-Burgos G, Hestrin S, Hill S, Hof PR, Huang J, Jones EG, Kawaguchi Y, Kisvarday Z, Kubota Y, Lewis DA, Marin O, Markram H, McBain CJ, Meyer HS, Monyer H, Nelson SB, Rockland K, Rossier J, Rubenstein JL, Rudy B, Scanziani M, Shepherd GM, Sherwood CC, Staiger JF, Tamas G, Thomson A, Wang Y, Yuste R, Ascoli GA. 2013. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat Rev Neurosci*, 14 (3):202-216.
- Dehmelt L, Halpain S. 2004. Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? *J Neurobiol*, 58 (1):18-33.
- Duan X, Chang JH, Ge S, Faulkner RL, Kim JY, Kitabatake Y, Liu XB, Yang CH, Jordan JD, Ma DK, Liu CY, Ganesan S, Cheng HJ, Ming GL, Lu B, Song H. 2007. Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell*, 130 (6):1146-1158.
- Dyson HJ, Wright PE. 2002. Insights into the structure and dynamics of unfolded proteins from nuclear magnetic resonance. *Adv Protein Chem*, 62:311-340.
- Eastwood SL, Harrison PJ. 2003. Interstitial white matter neurons express less reelin and are abnormally distributed in schizophrenia: towards an integration of molecular and morphologic aspects of the neurodevelopmental hypothesis. *Mol Psychiatry*, 8 (9):769, 821-731.
- Enomoto A, Asai N, Namba T, Wang Y, Kato T, Tanaka M, Tatsumi H, Taya S, Tsuboi D, Kuroda K, Kaneko N, Sawamoto K, Miyamoto R, Jijiwa M, Murakumo Y, Sokabe M, Seki T, Kaibuchi K, Takahashi M. 2009. Roles of disrupted-in-schizophrenia 1-interacting protein girdin in postnatal development of the dentate gyrus. *Neuron*, 63 (6):774-787.
- Falkai P. 2008. Diagnose, Ätiologie und Neuropathophysiologie der Schizophrenie. In: Neuropsychologie der Schizophrenie. 1. Auflage. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, S. 36-43.
- Fink AL. 2005. Natively unfolded proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 15 (1):35-41.
- Flores R, 3rd, Hirota Y, Armstrong B, Sawa A, Tomoda T. 2011. DISC1 regulates synaptic vesicle transport via a lithium-sensitive pathway. *Neurosci Res*, 71 (1):71-77.
- Freund TF. 2003. Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci*, 26 (9):489-495.
- Fukuda T, Kawano H, Ohyama K, Li HP, Takeda Y, Oohira A, Kawamura K. 1997. Immunohistochemical localization of neurocan and L1 in the formation of thalamocortical pathway of developing rats. *J Comp Neurol*, 382 (2):141-152.
- Garey LJ, Powell TP. 1971. An experimental study of the termination of the lateral geniculocortical pathway in the cat and monkey. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 179 (1054):41-63.

- Gershon ES, DeLisi LE, Hamovit J, Nurnberger JI, Jr., Maxwell ME, Schreiber J, Dauphinais D, Dingman CW, 2nd, Guroff JJ. 1988. A controlled family study of chronic psychoses. Schizophrenia and schizoaffective disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 45 (4):328-336.
- Gilbert CD, Kelly JP. 1975. The projections of cells in different layers of the cat's visual cortex. *J Comp Neurol*, 163 (1):81-105.
- Gilbert CD, Wiesel TN. 1979. Morphology and intracortical projections of functionally characterised neurones in the cat visual cortex. *Nature*, 280 (5718):120-125.
- Gopal PP, Simonet JC, Shapiro W, Golden JA. 2010. Leading process branch instability in *Lis1*^{+/-} nonradially migrating interneurons. *Cereb Cortex*, 20 (6):1497-1505.
- Harrison PJ. 1999. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain*, 122 (Pt 4):593-624.
- Hashimoto T, Volk DW, Eggan SM, Mirnics K, Pierri JN, Sun Z, Sampson AR, Lewis DA. 2003. Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *J Neurosci*, 23 (15):6315-6326.
- Hatten ME. 2002. New directions in neuronal migration. *Science*, 297 (5587):1660-1663.
- Hattori T, Shimizu S, Koyama Y, Yamada K, Kuwahara R, Kumamoto N, Matsuzaki S, Ito A, Katayama T, Tohyama M. 2010. *DISC1* regulates cell-cell adhesion, cell-matrix adhesion and neurite outgrowth. *Mol Psychiatry*, 15 (8):778, 798-809.
- Hattori T, Baba K, Matsuzaki S, Honda A, Miyoshi K, Inoue K, Taniguchi M, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Shimizu S, Yukioka F, Kumamoto N, Yamaguchi A, Tohyama M, Katayama T. 2007. A novel *DISC1*-interacting partner *DISC1*-Binding Zinc-finger protein: implication in the modulation of *DISC1*-dependent neurite outgrowth. *Mol Psychiatry*, 12 (4):398-407.
- Hayashi-Takagi A, Takaki M, Graziane N, Seshadri S, Murdoch H, Dunlop AJ, Makino Y, Seshadri AJ, Ishizuka K, Srivastava DP, Xie Z, Baraban JM, Houslay MD, Tomoda T, Brandon NJ, Kamiya A, Yan Z, Penzes P, Sawa A. 2010. Disrupted-in-Schizophrenia 1 (*DISC1*) regulates spines of the glutamate synapse via *Rac1*. *Nat Neurosci*, 13 (3):327-332.
- Hensch TK. 2005. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci*, 6 (11):877-888.
- Higginbotham HR, Gleeson JG. 2007. The centrosome in neuronal development. *Trends Neurosci*, 30 (6):276-283.
- Huang J, Roberts AJ, Leschziner AE, Reck-Peterson SL. 2012. *Lis1* acts as a "clutch" between the ATPase and microtubule-binding domains of the dynein motor. *Cell*, 150 (5):975-986.
- Hubel DH, Wiesel TN. 1962. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol*, 160:106-154.

- Inan M, Petros TJ, Anderson SA. 2013. Losing your inhibition: linking cortical GABAergic interneurons to schizophrenia. *Neurobiol Dis*, 53:36-48.
- Ishizuka K, Paek M, Kamiya A, Sawa A. 2006. A review of Disrupted-In-Schizophrenia-1 (DISC1): neurodevelopment, cognition, and mental conditions. *Biol Psychiatry*, 59 (12):1189-1197.
- Ishizuka K, Kamiya A, Oh EC, Kanki H, Seshadri S, Robinson JF, Murdoch H, Dunlop AJ, Kubo K, Furukori K, Huang B, Zeledon M, Hayashi-Takagi A, Okano H, Nakajima K, Houslay MD, Katsanis N, Sawa A. 2011. DISC1-dependent switch from progenitor proliferation to migration in the developing cortex. *Nature*, 473 (7345):92-96.
- Ishizuka K, Chen J, Taya S, Li W, Millar JK, Xu Y, Clapcote SJ, Hookway C, Morita M, Kamiya A, Tomoda T, Lipska BK, Roder JC, Pletnikov M, Porteous D, Silva AJ, Cannon TD, Kaibuchi K, Brandon NJ, Weinberger DR, Sawa A. 2007. Evidence that many of the DISC1 isoforms in C57BL/6J mice are also expressed in 129S6/SvEv mice. *Mol Psychiatry*, 12 (10):897-899.
- Jaaro-Peled H, Hayashi-Takagi A, Seshadri S, Kamiya A, Brandon NJ, Sawa A. 2009. Neurodevelopmental mechanisms of schizophrenia: understanding disturbed postnatal brain maturation through neuregulin-1-ErbB4 and DISC1. *Trends Neurosci*, 32 (9):485-495.
- Jablensky A, Sartorius N, Ernberg G, Anker M, Korten A, Cooper JE, Day R, Bertelsen A. 1992. Schizophrenia: manifestations, incidence and course in different cultures. A World Health Organization ten-country study. *Psychol Med Monogr Suppl*, 20:1-97.
- James R, Adams RR, Christie S, Buchanan SR, Porteous DJ, Millar JK. 2004. Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) is a multicompartimentalized protein that predominantly localizes to mitochondria. *Mol Cell Neurosci*, 26 (1):112-122.
- Joshi D, Fung SJ, Rothwell A, Weickert CS. 2012. Higher gamma-aminobutyric acid neuron density in the white matter of orbital frontal cortex in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 72 (9):725-733.
- Kalanithi PS, Zheng W, Kataoka Y, DiFiglia M, Grantz H, Saper CB, Schwartz ML, Leckman JF, Vaccarino FM. 2005. Altered parvalbumin-positive neuron distribution in basal ganglia of individuals with Tourette syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (37):13307-13312.
- Kamiya A, Kubo K, Tomoda T, Takaki M, Youn R, Ozeki Y, Sawamura N, Park U, Kudo C, Okawa M, Ross CA, Hatten ME, Nakajima K, Sawa A. 2005. A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat Cell Biol*, 7 (12):1167-1178.
- Kamiya A, Tomoda T, Chang J, Takaki M, Zhan C, Morita M, Cascio MB, Elashvili S, Koizumi H, Takanezawa Y, Dickerson F, Yolken R, Arai H, Sawa A. 2006. DISC1-NDEL1/NUDEL protein interaction, an essential component for neurite outgrowth, is modulated by genetic variations of DISC1. *Hum Mol Genet*, 15 (22):3313-3323.

- Kang E, Burdick KE, Kim JY, Duan X, Guo JU, Sailor KA, Jung DE, Ganesan S, Choi S, Pradhan D, Lu B, Avramopoulos D, Christian K, Malhotra AK, Song H, Ming GL. 2011. Interaction between FEZ1 and DISC1 in regulation of neuronal development and risk for schizophrenia. *Neuron*, 72 (4):559-571.
- Kendler KS, Diehl SR. 1993. The genetics of schizophrenia: a current, genetic-epidemiologic perspective. *Schizophr Bull*, 19 (2):261-285.
- Kepecs A, Fishell G. 2014. Interneuron cell types are fit to function. *Nature*, 505 (7483):318-326.
- Kim JY, Duan X, Liu CY, Jang MH, Guo JU, Pow-anpongkul N, Kang E, Song H, Ming GL. 2009. DISC1 regulates new neuron development in the adult brain via modulation of AKT-mTOR signaling through KIAA1212. *Neuron*, 63 (6):761-773.
- Kim JY, Liu CY, Zhang F, Duan X, Wen Z, Song J, Feighery E, Lu B, Rujescu D, St Clair D, Christian K, Callicott JH, Weinberger DR, Song H, Ming GL. 2012. Interplay between DISC1 and GABA signaling regulates neurogenesis in mice and risk for schizophrenia. *Cell*, 148 (5):1051-1064.
- Kirkpatrick B, Xu L, Cascella N, Ozeki Y, Sawa A, Roberts RC. 2006. DISC1 immunoreactivity at the light and ultrastructural level in the human neocortex. *J Comp Neurol*, 497 (3):436-450.
- Konradi C, Zimmerman EI, Yang CK, Lohmann KM, Gresch P, Pantazopoulos H, Berretta S, Heckers S. 2011. Hippocampal interneurons in bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 68 (4):340-350.
- Kopito RR. 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol*, 10 (12):524-530.
- Kriegstein AR, Noctor SC. 2004. Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci*, 27 (7):392-399.
- Kubo K, Tomita K, Uto A, Kuroda K, Seshadri S, Cohen J, Kaibuchi K, Kamiya A, Nakajima K. 2010. Migration defects by DISC1 knockdown in C57BL/6, 129X1/SvJ, and ICR strains via in utero gene transfer and virus-mediated RNAi. *Biochem Biophys Res Commun*, 400 (4):631-637.
- Kvajo M, McKellar H, Arguello PA, Drew LJ, Moore H, MacDermott AB, Karayiorgou M, Gogos JA. 2008. A mutation in mouse *Disc1* that models a schizophrenia risk allele leads to specific alterations in neuronal architecture and cognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (19):7076-7081.
- Kvajo M, McKellar H, Drew LJ, Lepagnol-Bestel AM, Xiao L, Levy RJ, Blazeski R, Arguello PA, Lacefield CO, Mason CA, Simonneau M, O'Donnell JM, MacDermott AB, Karayiorgou M, Gogos JA. 2011. Altered axonal targeting and short-term plasticity in the hippocampus of *Disc1* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (49):E1349-1358.

- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259):680-685.
- Lang UE, Puls I, Muller DJ, Strutz-Seebohm N, Gallinat J. 2007. Molecular mechanisms of schizophrenia. *Cell Physiol Biochem*, 20 (6):687-702.
- Lee FH, Zai CC, Cordes SP, Roder JC, Wong AH. 2013. Abnormal interneuron development in disrupted-in-schizophrenia-1 L100P mutant mice. *Mol Brain*, 6:20.
- Lee FH, Fadel MP, Preston-Maher K, Cordes SP, Clapcote SJ, Price DJ, Roder JC, Wong AH. 2011. Disc1 point mutations in mice affect development of the cerebral cortex. *J Neurosci*, 31 (9):3197-3206.
- Lehmann K, Steinecke A, Bolz J. 2012. GABA through the ages: regulation of cortical function and plasticity by inhibitory interneurons. *Neural Plast*, 2012:892784.
- Leliveld SR, Bader V, Hendriks P, Prikulis I, Sajnani G, Requena JR, Korth C. 2008. Insolubility of disrupted-in-schizophrenia 1 disrupts oligomer-dependent interactions with nuclear distribution element 1 and is associated with sporadic mental disease. *J Neurosci*, 28 (15):3839-3845.
- Leliveld SR, Hendriks P, Michel M, Sajnani G, Bader V, Trossbach S, Prikulis I, Hartmann R, Jonas E, Willbold D, Requena JR, Korth C. 2009. Oligomer assembly of the C-terminal DISC1 domain (640-854) is controlled by self-association motifs and disease-associated polymorphism S704C. *Biochemistry*, 48 (32):7746-7755.
- Lewis DA, Levitt P. 2002. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci*, 25:409-432.
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. 2005. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*, 6 (4):312-324.
- Lewis DA, Curley AA, Glausier JR, Volk DW. 2012. Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends Neurosci*, 35 (1):57-67.
- Li R, Gundersen GG. 2008. Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 (11):860-873.
- Liddington RC. 2004. Structural basis of protein-protein interactions. *Methods Mol Biol*, 261:3-14.
- Lund RD, Mustari MJ. 1977. Development of the geniculocortical pathway in rats. *J Comp Neurol*, 173 (2):289-306.
- Ma L, Liu Y, Ky B, Shughrue PJ, Austin CP, Morris JA. 2002. Cloning and characterization of Disc1, the mouse ortholog of DISC1 (Disrupted-in-Schizophrenia 1). *Genomics*, 80 (6):662-672.
- Maher BJ, LoTurco JJ. 2012. Disrupted-in-schizophrenia (DISC1) functions presynaptically at glutamatergic synapses. *PLoS One*, 7 (3):e34053.

- Mao Y, Ge X, Frank CL, Madison JM, Koehler AN, Doud MK, Tassa C, Berry EM, Soda T, Singh KK, Biechele T, Petryshen TL, Moon RT, Haggarty SJ, Tsai LH. 2009. Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3 β /beta-catenin signaling. *Cell*, 136 (6):1017-1031.
- Marin O. 2012. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*, 13 (2):107-120.
- Marin O, Rubenstein JL. 2001. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci*, 2 (11):780-790.
- Marin O, Rubenstein JL. 2003. Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci*, 26:441-483.
- Martini FJ, Valdeolmillos M. 2010. Actomyosin contraction at the cell rear drives nuclear translocation in migrating cortical interneurons. *J Neurosci*, 30 (25):8660-8670.
- Martini FJ, Valiente M, Lopez Bendito G, Szabo G, Moya F, Valdeolmillos M, Marin O. 2009. Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development*, 136 (1):41-50.
- McConnell SK. 1988. Development and decision-making in the mammalian cerebral cortex. *Brain Res*, 472 (1):1-23.
- McKenney RJ, Vershinin M, Kunwar A, Vallee RB, Gross SP. 2010. LIS1 and NudE induce a persistent dynein force-producing state. *Cell*, 141 (2):304-314.
- McManus MF, Nasrallah IM, Pancoast MM, Wynshaw-Boris A, Golden JA. 2004. Lis1 is necessary for normal non-radial migration of inhibitory interneurons. *Am J Pathol*, 165 (3):775-784.
- Metin C, Baudoin JP, Rakic S, Parnavelas JG. 2006. Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. *Eur J Neurosci*, 23 (4):894-900.
- Meyer KD, Morris JA. 2008. Immunohistochemical analysis of Disc1 expression in the developing and adult hippocampus. *Gene Expr Patterns*, 8 (7-8):494-501.
- Meyer KD, Morris JA. 2009. Disc1 regulates granule cell migration in the developing hippocampus. *Hum Mol Genet*, 18 (17):3286-3297.
- Millar JK, Christie S, Porteous DJ. 2003. Yeast two-hybrid screens implicate DISC1 in brain development and function. *Biochem Biophys Res Commun*, 311 (4):1019-1025.
- Millar JK, Christie S, Semple CA, Porteous DJ. 2000. Chromosomal location and genomic structure of the human translin-associated factor X gene (TRAX; TSNAX) revealed by intergenic splicing to DISC1, a gene disrupted by a translocation segregating with schizophrenia. *Genomics*, 67 (1):69-77.

- Millar JK, Christie S, Anderson S, Lawson D, Hsiao-Wei Loh D, Devon RS, Arveiler B, Muir WJ, Blackwood DH, Porteous DJ. 2001. Genomic structure and localisation within a linkage hotspot of Disrupted In Schizophrenia 1, a gene disrupted by a translocation segregating with schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 6 (2):173-178.
- Mohler H, Fritschy JM, Crestani F, Hensch T, Rudolph U. 2004. Specific GABA(A) circuits in brain development and therapy. *Biochem Pharmacol*, 68 (8):1685-1690.
- Morris JA, Kandpal G, Ma L, Austin CP. 2003. DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) is a centrosome-associated protein that interacts with MAP1A, MIPT3, ATF4/5 and NUDEL: regulation and loss of interaction with mutation. *Hum Mol Genet*, 12 (13):1591-1608.
- Moya F, Valdeolmillos M. 2004. Polarized increase of calcium and nucleokinesis in tangentially migrating neurons. *Cereb Cortex*, 14 (6):610-618.
- Murphy LC, Millar JK. 2017. Regulation of mitochondrial dynamics by DISC1, a putative risk factor for major mental illness. *Schizophr Res*, 187:55-61.
- Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong RO, Pearlman AL. 2001. Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci*, 4 (2):143-150.
- Nakata K, Lipska BK, Hyde TM, Ye T, Newburn EN, Morita Y, Vakkalanka R, Barenboim M, Sei Y, Weinberger DR, Kleinman JE. 2009. DISC1 splice variants are upregulated in schizophrenia and associated with risk polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (37):15873-15878.
- Nakazawa K, Zsiros V, Jiang Z, Nakao K, Kolata S, Zhang S, Belforte JE. 2012. GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology*, 62 (3):1574-1583.
- Namba T, Ming GL, Song H, Waga C, Enomoto A, Kaibuchi K, Kohsaka S, Uchino S. 2011. NMDA receptor regulates migration of newly generated neurons in the adult hippocampus via Disrupted-In-Schizophrenia 1 (DISC1). *J Neurochem*, 118 (1):34-44.
- Nasrallah IM, McManus MF, Pancoast MM, Wynshaw-Boris A, Golden JA. 2006. Analysis of non-radial interneuron migration dynamics and its disruption in *Lis1*^{+/-} mice. *J Comp Neurol*, 496 (6):847-858.
- Nicol X, Voyatzis S, Muzerelle A, Narboux-Neme N, Sudhof TC, Miles R, Gaspar P. 2007. cAMP oscillations and retinal activity are permissive for ephrin signaling during the establishment of the retinotopic map. *Nat Neurosci*, 10 (3):340-347.
- Nigg EA, Raff JW. 2009. Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell*, 139 (4):663-678.
- Ohyama K, Tan-Takeuchi K, Kutsche M, Schachner M, Uyemura K, Kawamura K. 2004. Neural cell adhesion molecule L1 is required for fasciculation and routing of thalamocortical fibres and corticothalamic fibres. *Neurosci Res*, 48 (4):471-475.

- Osburn N, Li J, O'Driscoll MC, Strominger Z, Wakahiro M, Rider E, Bukshpun P, Boland E, Spurrell CH, Schackwitz W, Pennacchio LA, Dobyns WB, Black GC, Sherr EH. 2011. Genetic and functional analyses identify DISC1 as a novel callosal agenesis candidate gene. *Am J Med Genet A*, 155a (8):1865-1876.
- Ottis P, Bader V, Trossbach SV, Kretschmar H, Michel M, Leliveld SR, Korth C. 2011. Convergence of two independent mental disease genes on the protein level: recruitment of dysbindin to cell-invasive disrupted-in-schizophrenia 1 aggresomes. *Biol Psychiatry*, 70 (7):604-610.
- Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A, Craddock N. 2011. Neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Br J Psychiatry*, 198 (3):173-175.
- Ozeki Y, Tomoda T, Kleiderlein J, Kamiya A, Bord L, Fujii K, Okawa M, Yamada N, Hatten ME, Snyder SH, Ross CA, Sawa A. 2003. Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC-1): mutant truncation prevents binding to Nude-like (NUDEL) and inhibits neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (1):289-294.
- Paspalas CD, Wang M, Arnsten AF. 2013. Constellation of HCN channels and cAMP regulating proteins in dendritic spines of the primate prefrontal cortex: potential substrate for working memory deficits in schizophrenia. *Cereb Cortex*, 23 (7):1643-1654.
- Porteous DJ, Thomson P, Brandon NJ, Millar JK. 2006. The genetics and biology of DISC1--an emerging role in psychosis and cognition. *Biol Psychiatry*, 60 (2):123-131.
- Raedler TJ, Knable MB, Weinberger DR. 1998. Schizophrenia as a developmental disorder of the cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol*, 8 (1):157-161.
- Rakic P. 1971. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J Comp Neurol*, 141 (3):283-312.
- Rakic P. 1974. Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science*, 183 (4123):425-427.
- Ramsey AJ, Milenkovic M, Oliveira AF, Escobedo-Lozoya Y, Seshadri S, Salahpour A, Sawa A, Yasuda R, Caron MG. 2011. Impaired NMDA receptor transmission alters striatal synapses and DISC1 protein in an age-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (14):5795-5800.
- Romero P, Obradovic Z, Li X, Garner EC, Brown CJ, Dunker AK. 2001. Sequence complexity of disordered protein. *Proteins*, 42 (1):38-48.
- Ross CA, Margolis RL, Reading SA, Pletnikov M, Coyle JT. 2006. Neurobiology of schizophrenia. *Neuron*, 52 (1):139-153.
- Rubenstein JL, Merzenich MM. 2003. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav*, 2 (5):255-267.

- Rudolph J, Gerstmann K, Zimmer G, Steinecke A, Doding A, Bolz J. 2014. A dual role of EphB1/ephrin-B3 reverse signaling on migrating striatal and cortical neurons originating in the preoptic area: should I stay or go away? *Front Cell Neurosci*, 8:185.
- Schaar BT, McConnell SK. 2005. Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (38):13652-13657.
- Schurov IL, Handford EJ, Brandon NJ, Whiting PJ. 2004. Expression of disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) protein in the adult and developing mouse brain indicates its role in neurodevelopment. *Mol Psychiatry*, 9 (12):1100-1110.
- Seshadri S, Kamiya A, Yokota Y, Prikulis I, Kano S, Hayashi-Takagi A, Stanco A, Eom TY, Rao S, Ishizuka K, Wong P, Korth C, Anton ES, Sawa A. 2010. Disrupted-in-Schizophrenia-1 expression is regulated by beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme-1-neuregulin cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (12):5622-5627.
- Shen S, Lang B, Nakamoto C, Zhang F, Pu J, Kuan SL, Chatzi C, He S, Mackie I, Brandon NJ, Marquis KL, Day M, Hurko O, McCaig CD, Riedel G, St Clair D. 2008. Schizophrenia-related neural and behavioral phenotypes in transgenic mice expressing truncated Disc1. *J Neurosci*, 28 (43):10893-10904.
- Shinoda T, Taya S, Tsuboi D, Hikita T, Matsuzawa R, Kuroda S, Iwamatsu A, Kaibuchi K. 2007. DISC1 regulates neurotrophin-induced axon elongation via interaction with Grb2. *J Neurosci*, 27 (1):4-14.
- Singh KK, Ge X, Mao Y, Drane L, Meletis K, Samuels BA, Tsai LH. 2010. Dixdc1 is a critical regulator of DISC1 and embryonic cortical development. *Neuron*, 67 (1):33-48.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150 (1):76-85.
- Soares DC, Carlyle BC, Bradshaw NJ, Porteous DJ. 2011. DISC1: Structure, Function, and Therapeutic Potential for Major Mental Illness. *ACS Chem Neurosci*, 2 (11):609-632.
- Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K. 2009. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, 459 (7247):698-702.
- Steinecke A, Gampe C, Nitzsche F, Bolz J. 2014. DISC1 knockdown impairs the tangential migration of cortical interneurons by affecting the actin cytoskeleton. *Front Cell Neurosci*, 8:190.
- Steinecke A, Gampe C, Valkova C, Kaether C, Bolz J. 2012. Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) is necessary for the correct migration of cortical interneurons. *J Neurosci*, 32 (2):738-745.
- Taya S, Shinoda T, Tsuboi D, Asaki J, Nagai K, Hikita T, Kuroda S, Kuroda K, Shimizu M, Hirotsune S, Iwamatsu A, Kaibuchi K. 2007. DISC1 regulates the transport of the NUDEL/LIS1/14-3-3epsilon complex through kinesin-1. *J Neurosci*, 27 (1):15-26.

- Taylor MS, Devon RS, Millar JK, Porteous DJ. 2003. Evolutionary constraints on the Disrupted in Schizophrenia locus. *Genomics*, 81 (1):67-77.
- Thomson PA, Malavasi EL, Grunewald E, Soares DC, Borkowska M, Millar JK. 2013. DISC1 genetics, biology and psychiatric illness. *Front Biol (Beijing)*, 8 (1):1-31.
- Tidemalm D, Langstrom N, Lichtenstein P, Runeson B. 2008. Risk of suicide after suicide attempt according to coexisting psychiatric disorder: Swedish cohort study with long term follow-up. *Bmj*, 337:a2205.
- Tomita K, Kubo K, Ishii K, Nakajima K. 2011. Disrupted-in-Schizophrenia-1 (Disc1) is necessary for migration of the pyramidal neurons during mouse hippocampal development. *Hum Mol Genet*, 20 (14):2834-2845.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76 (9):4350-4354.
- Tran PB, Miller RJ. 1999. Aggregates in neurodegenerative disease: crowds and power? *Trends Neurosci*, 22 (5):194-197.
- Tsai JW, Bremner KH, Vallee RB. 2007. Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue. *Nat Neurosci*, 10 (8):970-979.
- Tsai LH, Gleeson JG. 2005. Nucleokinesis in neuronal migration. *Neuron*, 46 (3):383-388.
- Turetsky BI, Moberg PJ, Yousem DM, Doty RL, Arnold SE, Gur RE. 2000. Reduced olfactory bulb volume in patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 157 (5):828-830.
- Uhlhaas PJ, Singer W. 2010. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*, 11 (2):100-113.
- Wang Q, Brandon NJ. 2011. Regulation of the cytoskeleton by Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1). *Mol Cell Neurosci*, 48 (4):359-364.
- Wang Q, Charych EI, Pulito VL, Lee JB, Graziane NM, Crozier RA, Revilla-Sanchez R, Kelly MP, Dunlop AJ, Murdoch H, Taylor N, Xie Y, Pausch M, Hayashi-Takagi A, Ishizuka K, Seshadri S, Bates B, Kariya K, Sawa A, Weinberg RJ, Moss SJ, Houslay MD, Yan Z, Brandon NJ. 2011a. The psychiatric disease risk factors DISC1 and TNK1 interact to regulate synapse composition and function. *Mol Psychiatry*, 16 (10):1006-1023.
- Wang Y, Kaneko N, Asai N, Enomoto A, Isotani-Sakakibara M, Kato T, Asai M, Murakumo Y, Ota H, Hikita T, Namba T, Kuroda K, Kaibuchi K, Ming GL, Song H, Sawamoto K, Takahashi M. 2011b. Girdin is an intrinsic regulator of neuroblast chain migration in the rostral migratory stream of the postnatal brain. *J Neurosci*, 31 (22):8109-8122.
- Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G, Alvarez-Buylla A. 2001. In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development*, 128 (19):3759-3771.

- Wonders CP, Anderson SA. 2006. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci*, 7 (9):687-696.
- Young-Pearse TL, Suth S, Luth ES, Sawa A, Selkoe DJ. 2010. Biochemical and functional interaction of disrupted-in-schizophrenia 1 and amyloid precursor protein regulates neuronal migration during mammalian cortical development. *J Neurosci*, 30 (31):10431-10440.
- Zhou M, Li W, Huang S, Song J, Kim JY, Tian X, Kang E, Sano Y, Liu C, Balaji J, Wu S, Zhou Y, Zhou Y, Parivash SN, Ehninger D, He L, Song H, Ming GL, Silva AJ. 2013. mTOR Inhibition ameliorates cognitive and affective deficits caused by *Disc1* knockdown in adult-born dentate granule neurons. *Neuron*, 77 (4):647-654.
- Zimmer G, Garcez P, Rudolph J, Niehage R, Weth F, Lent R, Bolz J. 2008. Ephrin-A5 acts as a repulsive cue for migrating cortical interneurons. *Eur J Neurosci*, 28 (1):62-73.
- Zimmer G, Rudolph J, Landmann J, Gerstmann K, Steinecke A, Gampe C, Bolz J. 2011. Bidirectional ephrinB3/EphA4 signaling mediates the segregation of medial ganglionic eminence- and preoptic area-derived interneurons in the deep and superficial migratory stream. *J Neurosci*, 31 (50):18364-18380.

9 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Biowissenschaftlichen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist und ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt habe. Dabei wurden keinerlei Textabschnitte Dritter oder eigener Prüfungsarbeiten ohne deren Kennzeichnung übernommen und keinerlei Hilfsmittel oder persönliche Mitteilungen ohne Angabe deren Quellen benutzt. Einige DNA-Konstrukte zur Transfektion der NIH3T3 Fibroblasten wurden von Christin Gampe hergestellt und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Hilfe von Promotionsberatern oder Dritter, welche mittelbar oder unmittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhielten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen, wurde nicht in Anspruch genommen. Die vorliegende Dissertation ist zuvor nicht bereits als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht worden. Ich versichere bisher keinerlei Dissertationen an einer Hochschule eingereicht zu haben.

Falk Nitzsche

10 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Bolz, der mir ermöglichte in seinem Institut diese Dissertation anzufertigen und der auf diesem Weg mein Interesse an der Mikroskopie und Immunzytochemie weckte. Er unterstützte mich in jeglicher Weise bei der Erstellung dieser Arbeit und ich konnte sehr von seinem Wissen auf dem Gebiet der Entwicklungsneurobiologie profitieren.

Bei Prof. Dr. Andreas Gebert möchte ich mich bedanken, da seine konstruktive Kritik am Manuskript dieser Arbeit eine sehr große Hilfe war. Die Gespräche mit ihm und die daraus gewonnene Motivation und der Wissensgewinn trugen maßgeblich zum Schreiben dieser Monografie bei.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie danken, die mir tagtäglich mit Wissen und Taten unter die Arme griffen. Dabei geht besonderer Dank an André Steinecke und Christin Gampe für ihre Hilfe beim Erlernen wichtiger Arbeitstechniken und die vielen schönen Stunden nach dem Labor der Sekretärin Frau Behr, welche für alle Anliegen eine Lösung fand und mit ihrer Art es immer vermochte die Stimmung aufzuhellen; Frau Raue und Frau Meier für ihre hervorragende Arbeit im Labor und Herrn Richter für die Hilfe am konfokalen Lasermikroskop.

Weiterhin möchte ich meinen Freunden danken, die während dieser Zeit immer ein offenes Ohr für mich hatten und immer für mich da sind; besonders Céline Heng-Kissenberger, Sandra Perrey, Frank Rub, Christian Carl und Andrea Rodewald.

Der größte Dank geht an meine Eltern und meine Lebensgefährtin Christine Kolbe, dafür dass sie immer an mich geglaubt haben, mich bei all meinen Ideen und Tun unterstützt haben und ich mich immer auf sie verlassen kann.

11 Anhang

An dieser Stelle ist eine Publikation angehängt, welche im Laufe der vorliegenden Dissertation veröffentlicht wurde.

Steinecke, A., Gampe, C., Nitzsche, F., Bolz, J, (2014): DISC1 Knockdown impairs the tangential migration of cortical interneurons by affecting the actin cytoskeleton, *Front. Cell. Neurosci.* 2014; 8:190



DISC1 knockdown impairs the tangential migration of cortical interneurons by affecting the actin cytoskeleton

André Steinecke[†], Christin Gampe[†], Falk Nitzsche and Jürgen Bolz*

Universität Jena, Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie, Jena, Germany

Edited by:

Qi Yuan, Memorial University,
Canada

Reviewed by:

David J. Price, The University of
Edinburgh, UK
Xiang Yu, CAS, China

*Correspondence:

Jürgen Bolz, Universität Jena,
Institut für Allgemeine Zoologie und
Tierphysiologie, Erbertstrasse 1,
07743 Jena, Germany
e-mail: jurgen.bolz@uni-jena.de

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) is a risk gene for a spectrum of major mental disorders. It has been shown to regulate radial migration as well as dendritic arborization during neurodevelopment and corticogenesis. In a previous study we demonstrated through *in vitro* experiments that DISC1 also controls the tangential migration of cortical interneurons originating from the medial ganglionic eminence (MGE). Here we first show that DISC1 is necessary for the proper tangential migration of cortical interneurons in the intact brain. Expression of EGFP under the Lhx6 promoter allowed us to analyze exclusively interneurons transfected in the MGE after *in utero* electroporation. After 3 days *in utero*, DISC1 deficient interneurons displayed prolonged leading processes and, compared to control, fewer neurons reached the cortex. Time-lapse video microscopy of cortical feeder-layers revealed a decreased migration velocity due to a reduction of soma translocations. Immunostainings indicated that DISC1 is co-localized with F-actin in the growth cone-like structure of the leading process. DISC1 knockdown reduced F-actin levels whereas the overall actin level was not altered. Moreover, DISC1 knockdown also decreased levels of phosphorylated Girdin, which cross-links F-actin, as well as the Girdin-activator pAkt. In contrast, using time-lapse video microscopy of fluorescence-tagged tubulin and EB3 in fibroblasts, we found no effects on microtubule polymerization when DISC1 was reduced. However, DISC1 affected the acetylation of microtubules in the leading processes of MGE-derived cortical interneurons. Together, our results provide a mechanism how DISC1 might contribute to interneuron migration thereby explaining the reduced number of specific classes of cortical interneurons in some DISC1 mouse models.

Keywords: DISC1, Schizophrenia, interneuron, cortical interneuron migration, cortical development

INTRODUCTION

Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) was originally discovered in a Scottish family in which a chromosomal translocation breaks this gene. More than 70% of those family members with DISC1 disruption were diagnosed as being schizophrenic, unipolar depressive or bipolar depressive (Millar et al., 2000). Many studies afterwards firmly established that DISC1 plays a major role in early brain development by regulating a number of essential neurodevelopmental events, including cell proliferation, neurite outgrowth, synapse formation and neuronal migration (for reviews see Ishizuka et al., 2006; Brandon et al., 2009; Soares et al., 2011; Narayan et al., 2013; Thomson et al., 2013). These pleiotropic actions of DISC1 are attributed to its many interaction partners, the DISC1 interactome (Camargo et al., 2007), making DISC1 a scaffold protein that impacts on many diverse brain functions.

We recently provided *in vitro* evidence that during embryonic development DISC1 is a necessary component for the correct tangential migration of cortical interneurons from the medial ganglionic eminence (MGE) to their target regions in the cortex (Steinecke et al., 2012). This is in accordance with previous

studies which found a reduced number of parvalbumin-positive interneurons in a mouse line that expresses the truncated human DISC1, as in the Scottish pedigree (Pletnikov et al., 2008; Ayhan et al., 2011). In the present study we first demonstrate the importance of DISC1 during tangential migration in the intact brain. For this we performed *in utero* electroporations and used constructs that either reduce endogenous DISC1 levels or that express a truncated murine form of DISC1 in combination with a vector that was only expressed in MGE-derived neurons. We then examined how DISC1 interferes with the cellular and the molecular machinery that drives glia-independent neuronal migration. We found that DISC1, by interacting with Girdin (girders of actin filaments) and Akt (also known as protein kinase B), regulates actin polymerization. In addition, DISC1 also influences the stability of microtubules. Thus, both cytoskeletal elements that have been implicated in interneuron migration, actin filaments and microtubule, are modified by DISC1.

Our results indicate that DISC1 has an impact on the migratory behavior of interneurons during early development that might lead to changes in the number or composition of interneurons in the cortex. Together, this work is supporting the

hypothesis that subtle perturbations in the developing brain may increase the risk for neuropsychiatric diseases later in life (Murray and Lewis, 1987; Weinberger, 1987; Cannon et al., 2002; Owen et al., 2011).

MATERIALS AND METHODS

MICE

Animals used were timed pregnant C57BL/6 mice. The day of insemination was considered as embryonic day (E) 1. Mice were killed using peritoneal injection of 10% chloral hydrate. All animal procedures were performed in agreement with the institutional regulations of the University of Jena.

PLASMIDS

Vectors expressing miRNA for DISC1 knockdown and control transfection were described previously (Steinecke et al., 2012). EmGFP has been removed for cotransfection. Additional vectors used: pLhx6-IRES-GFP (gift from Dr. Anderson), pCAX 1-597 (short DISC1, gift from Dr. Sawa), pEB3-GFP (gift from Dr. Galjart), pTubulin-GFP (coding sequence for α -tubulin cloned into pEGFP-C1 between XhoI and BamHI), pActin-RFP (coding sequence for β -actin cloned into pmRFP-C1 between XhoI and BamHI).

IN UTERO ELECTROPORATION

Timed pregnant mice (E13.5) were treated with 4 mg/kg Carprofen for 20 min before deeply anesthetizing with a mixture of fentanyl (0.05 mg/kg), midazolam (5 mg/kg), and metomidine (0.5 mg/kg). After the uterine horns were exposed various constructs together with pLhx6-IRES-GFP in a 4:1 ratio (2 μ g/ μ l DNA at all) were injected into the lateral ventricles of the embryos and electroporation (5 pulses 40 V, 100 ms duration) was carried out with a forceps electrode connected to a BTX ECM 830 (Harvard Apparatus). After 3 days *in utero* embryonic brains were fixed in 4% paraformaldehyde and vibratome sections (150 μ m) were immunostained against GFP (A6455, Invitrogen, 1:1000).

EX UTERO ELECTROPORATION

Brain hemispheres from E14.5 embryos were dissected in ice-cold sterile Krebs buffer [126 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.2 mM NaH_2PO_4 , 1.2 mM MgCl_2 , 2.1 mM CaCl_2 , 25 mM NaHCO_3 and 11 mM glucose]. *Ex utero* electroporation was performed as described previously (Yozu et al., 2005). In brief, miRNA solution was pressure injected into the ventricular zone of the MGE, followed by electroporation of 2 pulses a 100 ms duration and 100 V using a BTX ECM 830 (Harvard Apparatus).

PRIMARY CELL CULTURE AND IMMUNOSTAINING

After *ex utero* electroporation MGE were dissected and collected in ice-cold Hank's balanced salt solution (HBSS) supplemented with 0.65% glucose. After incubation with 0.025% trypsin in HBSS for 17 min at 37°C, tissue was dissociated into single cells by trituration and filtered through a nylon gauze to remove cell aggregates. Neurons were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) [supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 0.4 mM l-glutamine] at 37°C and 5% CO_2 .

For immunocytochemistry cells were incubated on coated cover slips (19.5 μ g/ml Laminin 5 μ g/ml poly-L-lysine) and fixed after 2 div in 4% PFA for 30 min and washed in 0.2% TritonX-100 in PBS, blocked in 10% serum, 5% BSA, and 0.2% TritonX-100 in PBS for 1 h followed by the incubation of the primary antibodies for 1 h or overnight. After washing cells were incubated for 1 h with the secondary antibody. After washing, nuclei were stained with 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Following antibodies have been used: anti-DISC1 [SantaCruz, DISC-1(N-16): sc-47990, 1:50]; anti-Actin (Hybridoma Bank, 1:50); anti-acTubulin (gift from Dr. Kessels, 1:400); anti-Akt/PKB [pS⁴⁷³] (Invitrogen, 1:100); anti-Girdin (S1416 phos) (IBL, 1:50). For staining of F-actin cells were incubated in phalloidin (Biotium, 1:100).

For cells stained against F-actin and actin an Axiovert-S100, 40 \times objective NA: 0.45 Plan Neofluar in combination with a Spot camera was used. Cells stained against DISC1, pGirdin and pAkt were scanned using a LSM510 (60 \times objective NA: 1.4 Plan Achromat; argon laser with 488 nm excitation, bandpass filter 500–550 nm emission; HeNe laser with 543 nm excitation, longpass filter 560 nm). Cells stained against acTubulin were scanned using a LSM510 (10 \times objective NA: 1.2 C-Achromat; argon laser with 488 nm excitation, bandpass filter 500–550 nm; HeNe laser 543 nm excitation, longpass filter 560 nm).

CORTICAL FEEDER-LAYER

Feeder-layers were prepared as described previously (Bortone and Polleux, 2009). In brief, cortex cells of E14.5 embryos were cultured on coated cover slips and *ex utero* electroporated cells of the MGE were placed on top. After incubation at 37°C and 5% CO_2 for 36 h time lapse analysis was started using a ZEISS LSM510 (20 \times objective NA: 0.75 Zeiss Plan Achromat; argon laser with 488 nm excitation, bandpass filter 500–550 nm emission) in combination with an incubation chamber (37°C and 5% CO_2).

OUTGROWTH ASSAY

For interneuron migration in a 3D substrate of plasma MGE of E14.5 embryos were dissected in MZ medium (0.4 g methyl cellulose, 5% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 1% L-glutamine, 0.1% glucose) and cut in 200 \times 200 μ m pieces using a tissue shopper. The MGE explants were precultured at 37°C and 5% CO_2 for 1 h, embedded in chicken plasma which was cross-linked with thrombin and cultured in MZ medium for 2 div before fixation with 4% paraformaldehyde. For staining of F-actin cells were incubated in phalloidin (Biotium, 1:100). For immunostaining following antibodies have been used: anti-DISC1 (SantaCruz, 1:50); anti-Tubulin (Hybridoma Bank, 1:200).

FIBROBLAST CELL CULTURE

NIH3T3 fibroblasts were grown in DMEM-F12 with 10% FBS, 5% Penicillin/Streptomycin (P/S) under standard cell culture conditions, transfected with various constructs using Lipofectamine2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol and incubated for 48 h. For time lapse analysis cells were scanned using a ZEISS LSM510 (Tubulin-GFP: 40 \times objective NA: 1.3 Plan Neofluar, EB3-GFP: 63 \times objective NA: 1.4 Plan Achromat; argon laser with 488 nm excitation, longpass filter

505 nm emission) in combination with an incubation chamber (37°C and 5% CO₂).

CELL ANALYSIS AND STATISTICS

Transfected cells were scanned using a Zeiss LSM510. Analysis of feeder-layer experiments was performed using the ZEN2011-LE software (ZEISS). Analysis of interneuron morphology as well as EB3 in fibroblasts was performed using ZEN2009 software (ZEISS). Fluorescence intensities were analyzed using ImageJ. At least three independent experiments were performed and analyzed. Significance was calculated using Student's *t*-test (Excel). For analysis of migration defects after *in utero* electroporation One-Way ANOVA [$F_{(2,99)} = 33.826, p < 0.001$] and *post-hoc* test (*p*-value indicated in the text) were performed using SPSS.

RESULTS

DECREASED TANGENTIAL MIGRATION OF DISC1 DEFICIENT CORTICAL INTERNEURONS *IN VIVO*

Our initial hypothesis of compromised interneuron migration after DISC1 knockdown was based on functional *in vitro* assays (Steinecke et al., 2012). Therefore, in the present study, our first goal was to examine the migration pattern of DISC1 deficient interneurons in the intact brain. For this, one experimental strategy would be to electroporate different constructs that suppress DISC1 specifically in the MGE of embryonic brains *in utero*. It has been reported that the ganglionic eminences can be selectively electroporated with ventrolateral placement of the positive electrode (Borrell et al., 2005). However, we and others could not exclusively target the MGE with this technique, instead transfected cells were found scattered or in clusters throughout the basal telencephalon and at the corticostriatal junction (Bai et al., 2008; Steinecke et al., 2012). To overcome this problem, Brown et al. (2011) used transgenic mice that express the TVA receptor selectively in the VZ of the MGE and POA and then performed *in utero* intraventricular injections of RCAS retroviruses to target MGE and POA neurons.

We developed a different technique to target cortical interneurons in the embryonic brain. For this we used the vector pLhx6-EGFP as reporter construct which contains the lim-homeobox gene 6 (Lhx6) promoter. With this vector, EGFP labeling should occur only in those transfected cells in which Lhx6 expression is stimulated by the transcription factor Nkx2.1 (Figure 1A). To test this we performed *ex utero* electroporation on brain hemispheres of E14.5 mouse embryos using a mixture of pLhx6-EGFP and alexa555-conjugated control siRNA that was injected into the MGE as well as the cortex before electroporation. Alexa555 of the siRNA was used to mark the tissue where plasmid solution was injected. After preparation of slices and culturing for 1 day *in vitro* EGFP was only expressed in cells of the MGE, but not in the cortex (Figure 1B). Thus, co-transfection of pLhx6-EGFP with control or DISC1 miRNA encoding constructs (Steinecke et al., 2012) in a 1:4 ratio was performed at E13.5 to study exclusively the migration of cells transfected within the MGE. The overrun of miRNA constructs prevented false-positive cells which were only transfected with the marker construct. After 3 days *in utero* the brains were fixed and a dense focus of EGFP+ cells was visible in the MGE, making it difficult to determine the precise number of these

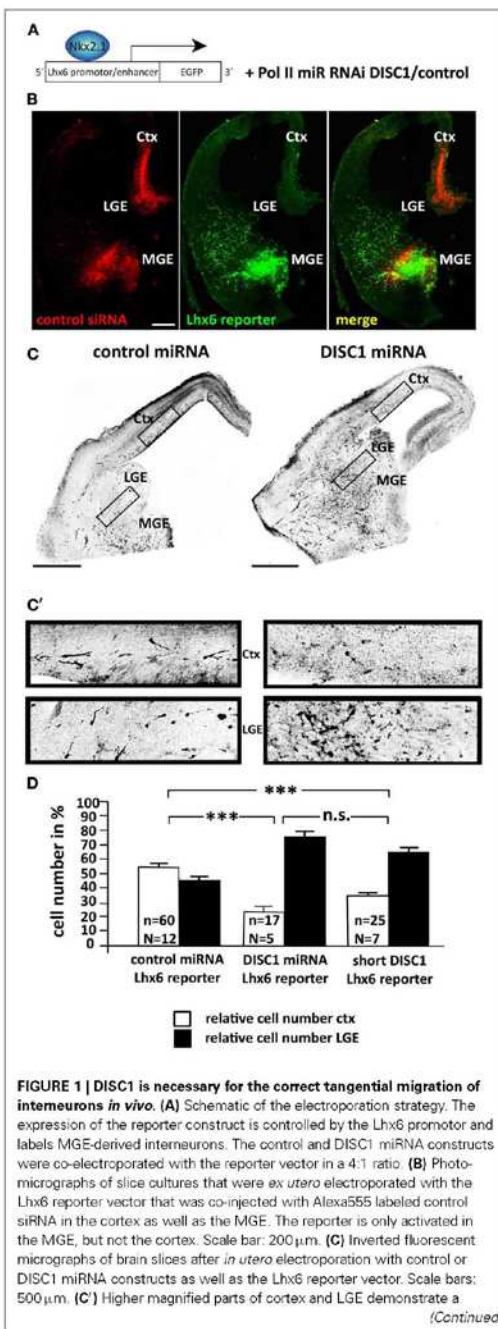


FIGURE 1 | DISC1 is necessary for the correct tangential migration of interneurons *in vivo*. (A) Schematic of the electroporation strategy. The expression of the reporter construct is controlled by the Lhx6 promoter and labels MGE-derived interneurons. The control and DISC1 miRNA constructs were co-electroporated with the reporter vector in a 4:1 ratio. (B) Photomicrographs of slice cultures that were *ex utero* electroporated with the Lhx6 reporter vector that was co-injected with Alexa555 labeled control siRNA in the cortex as well as the MGE. The reporter is only activated in the MGE, but not the cortex. Scale bar: 200 μ m. (C) Inverted fluorescent micrographs of brain slices after *in utero* electroporation with control or DISC1 miRNA constructs as well as the Lhx6 reporter vector. Scale bars: 500 μ m. (C') Higher magnified parts of cortex and LGE demonstrate a

(Continued)

FIGURE 1 | Continued

different cell distribution after expression of control or DISC1 miRNA. (D) Quantification of cells that migrated to the LGE and the cortex resulted in a decreased number of interneurons that reached the cortex in brains expressing DISC1 miRNA or short DISC1 compared to control transfected brains. Student's t-test: n.s. $p \geq 0.05$, *** $p < 0.001$. Error bars: s.e.m. "n" reflects the number of slices and "N" the number of brains.

neurons. We therefore counted the neurons that have migrated from the MGE into the LGE and compared this with the number of neurons that have migrated further and reached the cortex. Under control conditions, the number of cells in the LGE and in the cortex was roughly the same (cortex: $54.46 \pm 2.10\%$, LGE: $45.54 \pm 2.10\%$, 60 slices from 12 brains; Figures 1C,C',D). In contrast, expression of DISC1 miRNA caused a significant reduction of labeled cells that arrived in the cortex. Merely 24% of the cells reached the cortex at this time point, most of the cells were stuck in the LGE (cortex: $23.99 \pm 3.44\%$, LGE: $76.01 \pm 3.44\%$, 17 slices from 5 brains, $p < 0.001$; Figures 1C,C',D).

The truncated form of DISC1 that was found in a Scottish pedigree has been described as dominant negative (Kamiya et al., 2005). Transfecting MGE cells with expression vectors for shortened murine DISC1 led to a significant decrease in the number of cells in the cortex after 3 days *in utero* (cortex: $34.55 \pm 2.58\%$, LGE: $65.45 \pm 2.58\%$, 25 slices from 7 brains, $p < 0.001$ compared to control; Figure 1D). However, with 35% of cells reaching the cortex, truncated DISC1 caused a weaker migration defect compared to the DISC1 knockdown by miRNA.

As our previous results showed alterations in the cell morphology after DISC1 miRNA expression (Steinecke et al., 2012), we analyzed the processes of transfected cells that had left the MGE and reached the LGE after 3 days *in vivo*. In accordance with this earlier study, cells that expressed DISC1 miRNA or a short form of DISC1 exhibited prolonged leading processes compared to control transfected cells (control: $38 \pm 4 \mu\text{m}$, 27 cells; DISC1 miRNA: $51 \pm 5 \mu\text{m}$, 24 cells, $p < 0.05$; short DISC1: $59 \pm 5 \mu\text{m}$, 27 cells, $p < 0.01$; Figures 2A,B).

Thus, using a reporter construct for Lhx6 positive cells we could demonstrate that DISC1 is an essential component for the correct migration of cortical interneurons in the intact brain. Knockdown of DISC1 as well as the expression of a dominant negative form led to a delayed migration after 3 days *in vivo*. Considering that for technical reasons we could only analyze cells that were able to leave the MGE after transfection, the migration abnormalities caused by DISC1 deficiency might be even more pronounced than described here.

DYNAMICS OF SOMA TRANSLOCATIONS AFTER DISC1 KNOCKDOWN IN CORTICAL INTERNEURONS

To understand the underlying cellular mechanism of how DISC1 regulates interneuron migration we went back from the *in vivo* approach to *in vitro* systems. Therefore, we injected plasmid solution into the MGE of prepared hemispheres and electroporated them *ex utero*. Afterwards single cells were generated and cultured on cortical feeder-layers. Using time-lapse video microscopy to visualize the complex migration behavior of interneurons it was

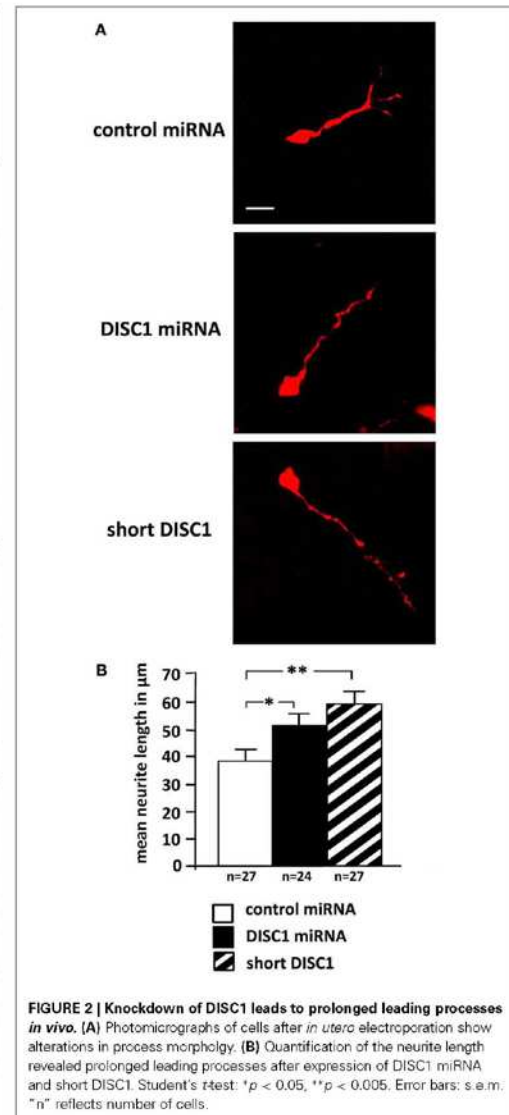
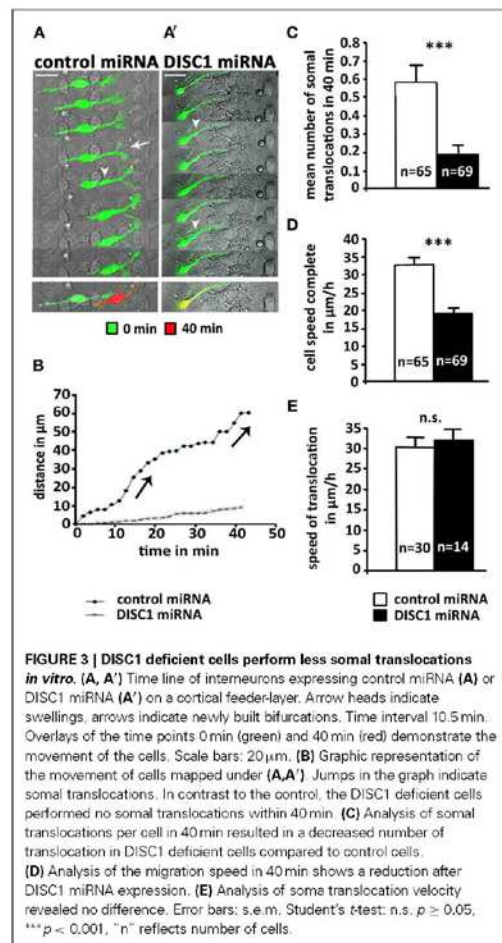


FIGURE 2 | Knockdown of DISC1 leads to prolonged leading processes *in vivo*. (A) Photomicrographs of cells after *in utero* electroporation show alterations in process morphology. (B) Quantification of the neurite length revealed prolonged leading processes after expression of DISC1 miRNA and short DISC1. Student's t-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. Error bars: s.e.m. "n" reflects number of cells.

possible to analyze the dynamic of individual migrating cells on a two-dimensional substrate. Figure 3A depicts a typical cell transfected with control miRNA. As illustrated in Figure 3B, two soma translocations occurred within the 40 min recording period. In addition, a highly dynamic growth cone-like structure is visible at the leading process tip exhibiting bifurcations (arrow) and swellings (arrow head). In contrast, the DISC1 miRNA



transfected cell in Figure 3A' exhibited a thin, prolonged and less branched leading process and the growth cone-like structure was greatly reduced compared to control cells. Although swellings (arrow heads) appeared several times, a soma translocation did not occur. A graphic representation of the trajectories of these two cells is illustrated in Figure 3B. Whereas the control transfected cell exhibits the typical saltatory pattern of interneuron migration, with leading process extension followed by soma translocation and retraction of the trailing process, there was almost no translocation of the DISC1 deficient interneuron, while the leading process was constantly moving. Consistently, in contrast to the control, no trailing process was identifiable in these cells (Figure 3A').

Analyzing all cells monitored within 40 min we found a significant reduction of soma translocations after DISC1 knockdown.

About half of the control cells performed at least one soma translocation within the 40 min recording period (30 out of 65), whereas only 14 out of 69 DISC1 deficient neurons exhibited a soma translocation. The mean number of soma translocations was 0.6 ± 0.1 after transfection with control miRNA and 0.2 ± 0.1 after transfection with DISC1 miRNA ($p < 0.001$; Figure 3C). In accordance with this observation, the mean velocity of DISC1 deficient interneurons ($19 \pm 1 \mu\text{m/h}$) was significantly lower than for control neurons ($32 \pm 2 \mu\text{m/h}$; $p < 0.001$, Figure 3D). However, when translocations occurred in DISC1 deficient interneurons, this arose at the same speed as in control cells (control miRNA: $30 \pm 2 \mu\text{m/h}$, 30 cells; DISC1 miRNA: $32 \pm 2 \mu\text{m/h}$, 14 cells; $p > 0.05$, n.s.; Figure 3E).

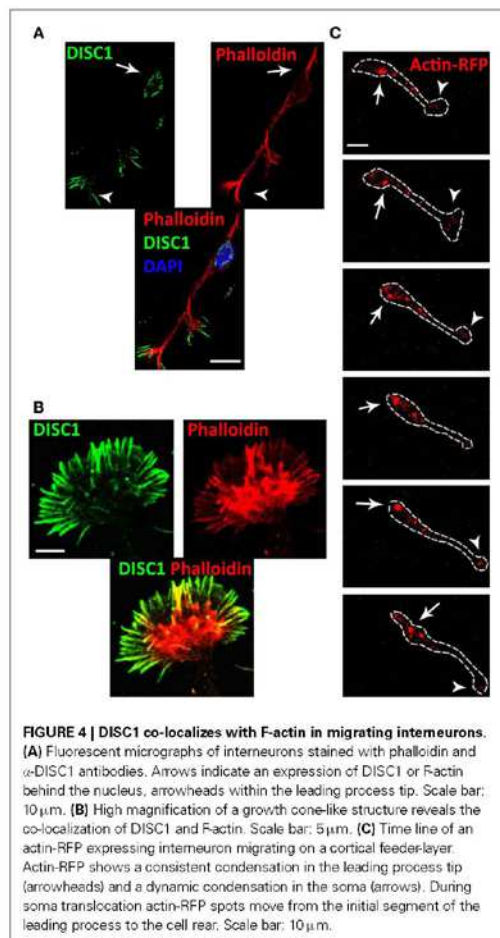
In conclusion, after DISC1 knockdown MGE-derived interneurons display less soma translocations on a cortical feeder-layer than control cells. The velocity of soma translocation is not altered in DISC1 deficient interneurons, suggesting that their migration defects are caused by alterations of the intracellular coordination between several components of the migration machinery.

DYNAMICS OF THE ACTIN CYTOSKELETON AFTER DISC1 KNOCKDOWN IN CORTICAL INTERNEURONS

Previous studies provided evidence that the actin cytoskeleton is essential for glia-independent migration of neurons, exerting pushing and/or pulling forces (He et al., 2010; Martini and Valdeolmillos, 2010). Therefore, we examined the distribution of actin and DISC1 at the subcellular level in cortical interneurons. For this phalloidin staining of interneurons migrating in a 3D substrate of plasma was used to label filamentous (F)-actin in combination with DISC1 immunostainings using an antibody raised against a peptide mapping near the N-terminus of the DISC1 protein. Confirming our previous results (Steinecke et al., 2012), both DISC1 and F-actin were located behind the nucleus and in the tips of the leading processes (Figure 4A). Within the growth cone-like structure, DISC1 is in front of F-actin in the filopodia, as illustrated at high magnification in Figure 4B.

To monitor actin dynamics in migrating interneurons we performed time-lapse video microscopy of actin-RFP expressing MGE cells on a cortical feeder layer. In this experiment, the fluorescence RFP signal reports both globular (G-) actin as well as F-actin. However, counterstaining of transfected cells with phalloidin indicated that highly condensed RFP indicates predominantly F-actin (Lee et al., 2013). Our time-lapse movies reveal that during migration on cortical feeder-layers dynamic condensations of actin filaments occurred within the cell soma as well as in the leading process tip of interneurons. F-actin signals appeared in front of the nucleus and moved sideways to the back during soma translocation (Figure 4C and Supplementary Movie). Within the highly dynamic growth cone-like structure accumulation of actin-RFP occurred frequently.

The growth cone-like structure of interneurons is more elaborated than in radial migrating cortical projection neurons (Rakic, 1971; Bellion et al., 2005). It has been demonstrated that severing the tip of the leading process or restricting its dynamics stopped soma translocation (He et al., 2010). To study if DISC1 knockdown induced alterations of the actin cytoskeleton we



analyzed the growth cone-like structure of fixed control miRNA and DISC1 miRNA expressing interneurons and compared their relative fluorescence intensities. In DISC1 deficient cells phalloidin staining was considerably less intense than in control miRNA transfected cells (control miRNA/untransfected: 1.21 ± 0.07 , 78 cells; DISC1 miRNA/untransfected: 0.81 ± 0.04 , 73 cells; $p < 0.001$; **Figures 5A,E**) indicating a decrease of F-actin in the leading process tips. To examine whether this reduction of filaments resulted from a decline in protein levels we performed immunocytochemistry using a pan antibody, binding both to G- and F-actin. There was no difference in the fluorescence intensities between cells expressing control or DISC1 miRNA (control miRNA/untransfected: 1.03 ± 0.05 , 43 cells; DISC1 miRNA/untransfected: 1.05 ± 0.04 , 57 cells; n.s. $p > 0.05$, n.s.; **Figures 5B,E**).

Previous studies indicated that Girdin (girders of actin filaments) is one of the many interaction partners of DISC1, which cross-links actin filaments (Enomoto et al., 2006, 2009). Moreover, it has also been demonstrated that Girdin is a regulator of neuroblast chain migration in the rostral migratory stream of the postnatal brain and the number of cortical interneurons is significantly decreased in Girdin^{-/-} mice compared with wild-type animals (Wang et al., 2011). We therefore analyzed the amount of activated, phosphorylated Girdin (pGirdin) in leading process tips of cortical interneurons. After DISC1 knockdown the pGirdin signal was reduced by 30% compared to control levels (control miRNA/untransfected: 1.32 ± 0.97 , 44 cells; DISC1 miRNA/untransfected: 0.91 ± 0.70 , 42 cells; $p < 0.05$; **Figures 5C,E**).

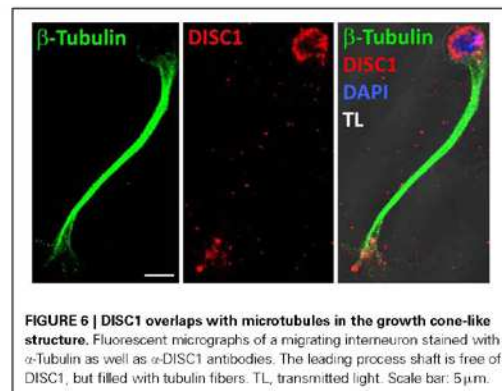
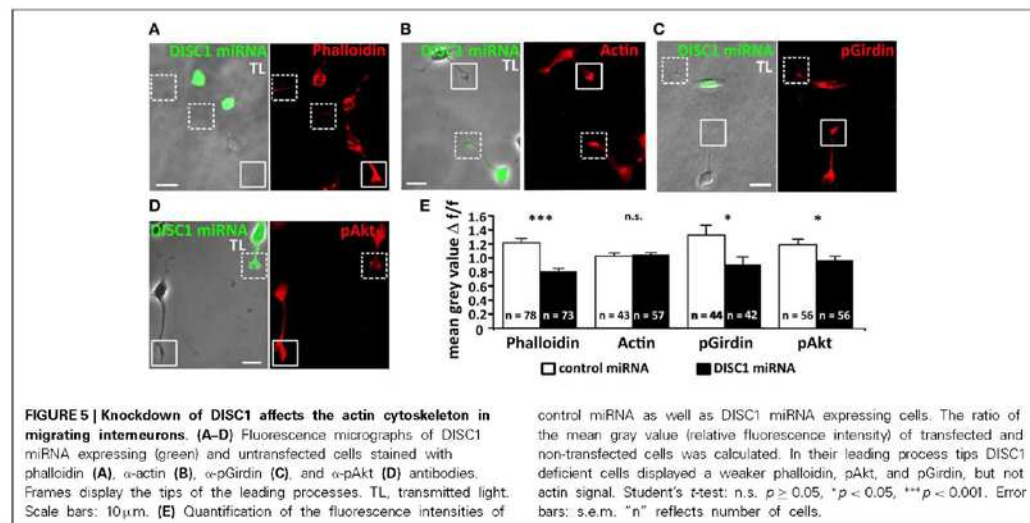
Although DISC1 was discovered as a binding partner of Girdin, so far there is no evidence that DISC1 directly activates Girdin. However, one known activator of Girdin is Akt, also known as protein kinase B (PKB), a serine/threonine kinase. Activated Akt (pAkt) phosphorylates serine at position 1416 in Girdin, and activated pGirdin accumulates at the leading edge of migrating cells (Enomoto et al., 2005, 2009). Therefore, we examined the effect of DISC1 knockdown on pAkt levels in the growth cone-like structure of migrating cortical interneurons and found a significant reduction compared to control cells (control miRNA/untransfected: 1.19 ± 0.08 , 56 cells; DISC1 miRNA/untransfected: 0.97 ± 0.07 , 56 cells; $p < 0.05$; **Figures 5D,E**).

Taken together, these results indicate that leading process tips of DISC1 deficient interneurons display lower F-actin levels compared to control. The decrease of activated forms of Girdin and Akt, which are responsible for the cross-linking of actin filaments, supports the idea that DISC1 knockdown influences the actin cytoskeleton in the growth cone-like structures of migrating interneurons and thereby interferes with their migration.

ALTERATIONS OF MICROTUBULES OF DISC1 DEFICIENT CORTICAL INTERNEURONS

So far we analyzed the effects of a DISC1 knockdown on the actin cytoskeleton in the leading process tip. But the growth cone-like structure is unlikely characterized by actin only. In axonal growth cones different forms of actin are functionally linked to microtubules which also play an essential role during growth cone dynamics. Immunostaining of MGE cells migrating in a 3D substrate revealed that the leading process shaft is completely filled with microtubules which partially enter the growth cone-like structure where DISC1 is expressed (**Figure 6**, Steinecke et al., 2012). This as well as the observed alterations of the leading process morphology (**Figure 2**, Steinecke et al., 2012) imply effects on the microtubule cytoskeleton after DISC1 knockdown. We therefore analyzed the microtubule cytoskeleton in DISC1 deficient cells.

First, we examined the overall tubulin level of NIH3T3 that were transfected with control or DISC1 miRNA encoding vectors using western blot analysis. Reduction of DISC1 led neither to an increase nor a decrease of tubulin on the protein level in those cells (**Figure 7A**).

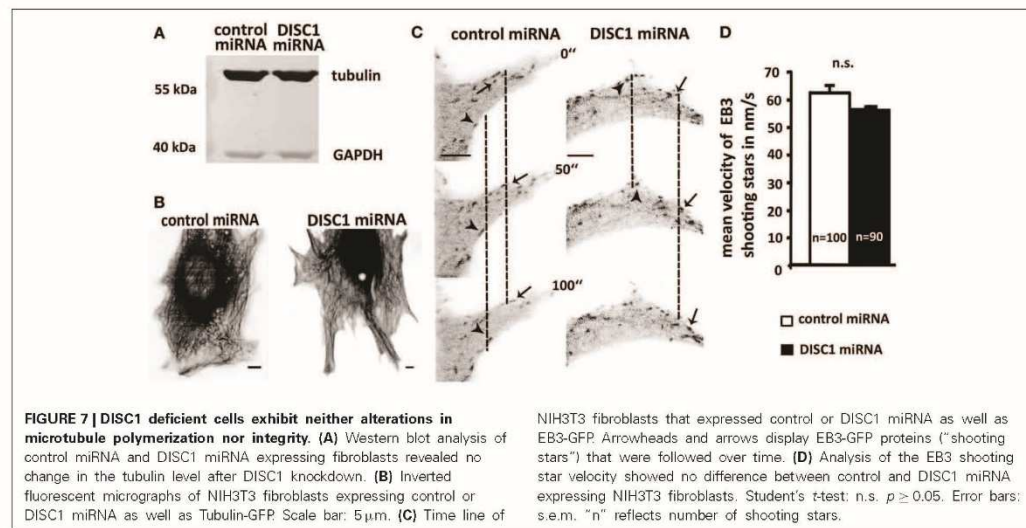


As the tubulin level seemed not to be changed, we investigated the effect of the DISC1 knockdown on microtubule polymerization and network integrity. For this we visualized the microtubule cytoskeleton in NIH3T3 fibroblasts and performed time lapse video microscopy. Using fluorescence-tagged tubulin we were able to monitor the whole microtubule cytoskeleton of living miRNA expressing fibroblasts. Like under control conditions DISC1 deficient cells displayed a compact and shape filling tubulin network involving elongated and curled regions with stable as well as dynamic microtubules. Conspicuousities like microtubules that did not reach the cell cortex or instable microtubules that were consistently retracted could not be observed (Figure 7B).

Next we analyzed the velocity of tubulin polymerization using GFP-tagged EB3 (end-binding protein 3). This microtubule binding protein is specifically associated with the ends of

growing microtubules and therefore enables the visualization of microtubule growth in living cells (Stepanova et al., 2003). Analyzing these EB3-GFP signals that appear over time ("shooting stars") we found no difference between control and DISC1 miRNA expressing NIH3T3 fibroblasts which means neither an increased nor a reduced velocity of microtubule polymerization after DISC1 knockdown (Figures 7C,D; control miRNA: 62.5 ± 2.8 nm/s, 100 shooting stars, 14 cells; DISC1 miRNA: 56.8 ± 4.1 nm/s, 90 shooting stars, 15 cells; n.s. *p* > 0.05).

In growing axons the stabilization of microtubules plays an essential role in the correct movement of the growth cone. Stable bundles of microtubules fill the axon shaft and extend into the growth cone. There they are belt by actin arcs and stabilized by microtubule-associated proteins. Single dynamic filaments reach out of the stable bundles and explore the periphery. Since dynamic microtubules act as guidance sensors, stable bundles are necessary for axonal forward movement. Locally induced stabilization and dynamic are required for growth cone turning and branching. (reviewed in Lowery and Van Vactor, 2009; Kalil and Dent, 2014). To examine whether a DISC1 knockdown effects the selective stabilization of microtubules in the growth cone-like structure of migrating interneurons, we analyzed the acetylation of microtubules in fixed MGE cells. Although this post-translational modification seems not to have an influence on polymerization or depolymerization of microtubules by itself, it is presumed to be a marker for stabilization (Schulze et al., 1987; Westermann and Weber, 2003). We performed immunocytochemistry on MGE cells and found a significant decrease of acetylation at the distal end of the leading process after DISC1 knockdown. In control cells from the cell body into the growth cone-like structure. In DISC1 deficient cells only 87% of the leading process length from the cell body toward the leading process tip was acetylated (Figures 8A,B; control miRNA: length of



acetylated tubulin signal relative to the leading process length: 0.96 ± 0.01 , 48 cells; DISC1 miRNA: length of acetylated tubulin signal relative to the leading process length: 0.87 ± 0.02 , 52 cells; $***p < 0.001$). Thus, stable microtubule bundles are no longer reaching into the growth cone-like structure in DISC1 deficient cortical interneurons.

Taken together, in interneurons with decreased DISC1 levels microtubule stabilization is reduced at the leading process tip where stable microtubule bundles reach into the growth cone-like structure. This effect seems not to be mediated by altered polymerization and dynamic of microtubules.

DISCUSSION

More than a decade after the first description of DISC1 as a susceptibility gene for major psychiatric disorders, multiple studies attempted to trace its potential functions during brain development. It has become clear that DISC1 is crucial for the correct development of several telencephalic structures by regulation, e.g., cell division, synapse formation or neuronal migration (reviewed in Brandon et al., 2009; Soares et al., 2011; Narayan et al., 2013). Using a variety of *in vitro* assays, in our previous study we found evidence that DISC1 knockdown by RNA interference results in a migration defect of MGE-derived cortical interneurons (Steinecke et al., 2012). Here we first demonstrate that DISC1 is essential for the proper tangential migration of cortical interneurons *in vivo*. We then examined that underlying cellular and molecular mechanisms that lead to the migration defects of DISC1 deficient interneurons. Our results indicate that DISC1, via interactions with Akt and Girdin, influences network structure and stabilization of actin filaments. In addition, DISC1 also influences the stability of microtubules but had no effect microtubule polymerization.

DISC1 PLAYS A CRITICAL ROLE IN TANGENTIAL MIGRATION OF CORTICAL INTERNEURONS

Although some DISC1 models have been generated (Cash-Padgett and Jaaro-Peled, 2013), up to now there is no DISC1 knockout mouse available to study directly the potential of DISC1 during brain development. Therefore, we used RNA interference techniques to study the impact of DISC1 on neuronal migration. By performing *in utero* electroporation we were able to reduce the level of DISC1 in cells of the ganglionic eminences at a defined time point during development. It has been claimed that it is possible to aim exclusively the MGE with this technique (Borrell et al., 2005). However, we and others were not able to restrict the transfection region to this part of the eminences, but rather almost always got many labeled cells in the basal as well as in the dorsal telencephalon after electroporation (Bai et al., 2008; Steinecke et al., 2012). To overcome this problem and to analyze only MGE-derived cells we used a marker that is expressed exclusively in Lhx6⁺ cells, a transcription factor specific for postmitotic cortical interneurons generated in the MGE. This was confirmed by injecting plasmids in the MGE and cortex in brain slices. After electroporation, labeled neurons were only found in the MGE and not in the dorsal telencephalon. Using this approach, we found that after DISC1 knockdown fewer interneurons reached the cortex compared to control transfected cells. Similar experiments with a dominant-negative form of DISC1 also lead to migration defects, although they have been less pronounced compared to DISC1 knockdown.

Previous studies found abnormal migration after DISC1 knockdown in cortical projection neurons which migrate radially from the ventricular zone into the developing cortical plate (Kamiya et al., 2005; Kubo et al., 2010; Young-Pearse et al., 2010). Delayed migration has also been described for DISC1 deficient

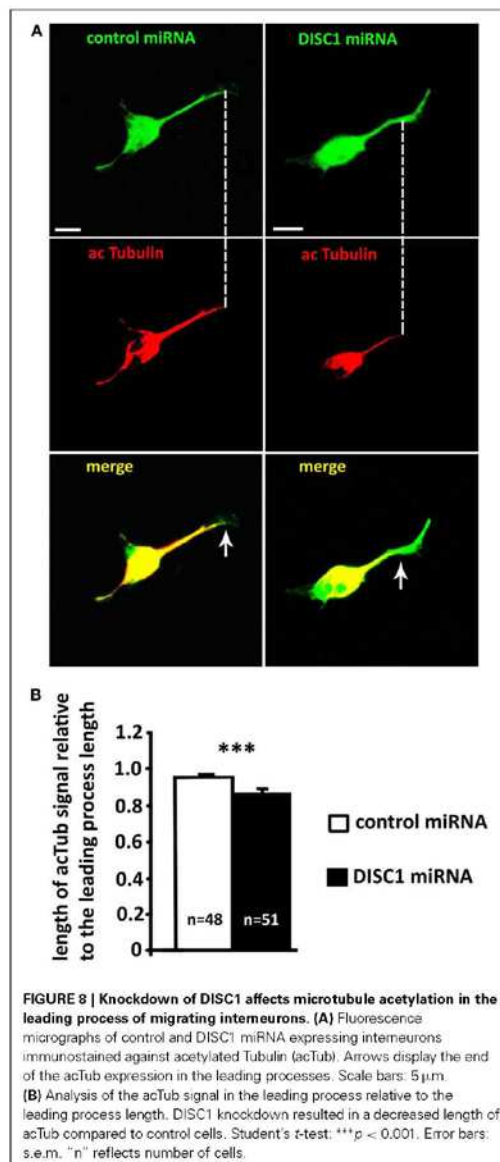


FIGURE 8 | Knockdown of DISC1 affects microtubule acetylation in the leading process of migrating interneurons. (A) Fluorescence micrographs of control and DISC1 miRNA expressing interneurons immunostained against acetylated Tubulin (acTub). Arrows display the end of the acTub expression in the leading processes. Scale bars: 5 μ m. **(B)** Analysis of the acTub signal in the leading process relative to the leading process length. DISC1 knockdown resulted in a decreased length of acTub compared to control cells. Student's t-test: *** $p < 0.001$. Error bars: s.e.m. "n" reflects number of cells.

neurons in the developing hippocampus (Meyer and Morris, 2009; Tomita et al., 2011). Surprisingly, in the adult hippocampus, newly generated neurons over-migrated their target after DISC1 knockdown (Duan et al., 2007; Enomoto et al., 2009; Kim et al., 2009). Thus, DISC1 seems to have opposite effects on neuronal migration of developing and adult hippocampal neurons.

Finally, DISC1 seems to have no impact on postnatal neuroblast migration within the rostral migratory stream (Wang et al., 2011). Thus, the influence of DISC1 on neuronal migration appears to be cell type specific and can also depend on the developmental stage of the neurons.

The loss of DISC1 binding partners can also lead to defects in neuronal migration. A prominent example is LIS1 that interacts with DISC1 at the centrosome (Kamiya et al., 2005). LIS1 deficient cortical projection neurons as well as cortical interneurons exhibit a delayed migration. This is caused by the reduction of the rate of nuclear movement, whereas process extension remains unaffected, resulting in prolonged and less branched leading processes (McManus et al., 2004; Nasrallah et al., 2006; Gopal et al., 2010). These results are reminiscent to effects observed after DISC1 knockdown (Steinecke et al., 2012, present results). The fact that impairment of LIS1 function results in migration defects and causes lissencephaly (Kato and Dobyns, 2003) underlines the relevance of DISC1 and its interacting partners during brain development.

DISC1 INTERFERES WITH THE ACTIN CYTOSKELETON IN MIGRATING INTERNEURONS

Tangential migration of cortical interneurons differs from radial migration in several respects (reviewed in Nadarajah and Parnavelas, 2002; Marin and Rubenstein, 2003). Unlike cortical projection neurons, cortical interneurons originate in the ventral telencephalon and therefore have to migrate over much longer distances to reach their final destination in the developing cortex. As these cells have to find their way without guidance of glial fibers they exhibit a distinctive growth cone-like structure at the leading process tip which is thought to "explore" the environment and make steering decisions. (reviewed in Marin and Rubenstein, 2001). Its branched and highly dynamic appearance is crucial for interneuron migration (Bellion et al., 2005; Metin et al., 2006; Valiente and Martini, 2009; He et al., 2010). During tangential migration cortical interneurons consistently repeat two steps: (I) elongation of the leading process and (II) soma translocation combined with elongation stop and branching of the growth cone-like structure (Bellion et al., 2005). Accordingly, suppression of soma translocation by blocking the actin-associated motor protein nonmuscle myosin II or inhibition of ROCK, a Rho effector that regulates myosin II activity results in prolonged and very thin processes (Bellion et al., 2005; Shinohara et al., 2012). Likewise, in this study knockdown of DISC1 decreased the number of soma translocations on cortical feeder-layers and caused the elongation of leading processes.

Several previous studies indicate a crucial role of actin dynamics during soma translocation. It has been shown that nucleokinesis is associated with a precise pattern of actin condensations characterized by the initial formation of a cup-like structure at the rear nuclear pole. This is followed by a progressive acto-myosin contraction that drives the nucleus forward and concludes with an actin spot at the base of the retracting trailing process (Bellion et al., 2005; Martini and Valdeolmillos, 2010; Shinohara et al., 2012). Furthermore, enriched F-actin signals have been observed in the leading process tip and also in front of the nucleus where they appear prior to translocation events and move to the

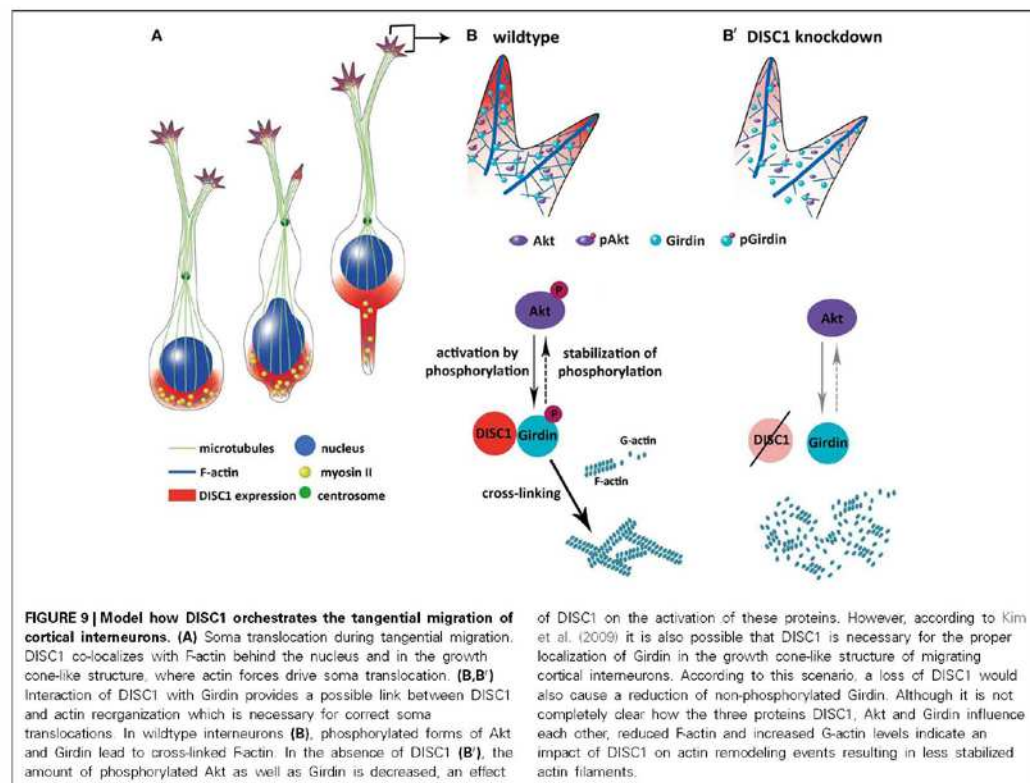
direction of the leading process (Shinohara et al., 2012). It has been proposed that the soma is actively pulled forward by a F-actin flow along the leading process. This is based on results from migrating cerebellar granule cells where somal translocation is suppressed by severing the leading process tip and/or local disruption of F-actin along the leading process. Experiments using localized application of F-actin stabilizing and destabilizing agents revealed the necessity of actin dynamics especially within the growth cone-like structure at the leading process tip. In contrast, local perfusion of actin modulating agents at the cell soma has no effect on nucleokinesis (He et al., 2010). Using time-lapse video microscopy of actin-RFP expressing MGE cells we found evidence for both models of pushing and pulling the nucleus forward (Figure 4C).

Given that actin remodeling is necessary for the correct interneuron migration we investigated the role of DISC1 on the actin cytoskeleton. For this we analyzed the leading process tips after DISC1 knockdown and found less F-actin in the growth cone-like structure compared to control cells. This result is comparable to the effect of a LIS1 knockdown in radially migrating neurons, which also display a migration defect as described above (Kholmanskikh et al., 2003). Thus, DISC1 seems to have

an impact on F-actin remodeling at the leading edge, which is essential for neuronal migration.

A binding partner of DISC1 involved in actin remodeling is Girdin (Camargo et al., 2007). After phosphorylation by Akt it detaches from the cell membrane and cross-links newly built actin filaments (Enomoto et al., 2006). Currently, there are two different hypothesis about the role of DISC1 and Girdin in newborn granule cells of the adult hippocampus. According to Kim et al. (2009), DISC1 prevents the interaction of Girdin and Akt and therefore decreases the activation of Girdin by Akt. In contrast, another study points out the function of DISC1 to localize Girdin in growth cones thereby promoting Girdin activation at the axonal tip (Enomoto et al., 2009). Here we show that knockdown of DISC1 caused a reduction of F-actin, activated Girdin as well as activated Akt in the growth cone-like structure of cortical interneurons. Although it is not clear how DISC1 and Girdin interact, these results indicate a role of DISC1 in actin remodeling during tangential migration.

In summary, DISC1 is expressed in the leading process tip as well as in the cell soma mainly behind the nucleus of migrating MGE cells (Figure 9, Steinecke et al., 2012) overlapping with phalloidin stained F-actin. Considering the growth cone-like



structure at the end of the leading process reduced expression levels of DISC1 lead to less F-actin since the overall protein level of actin is not decreased. Additionally, reduction of active forms of the actin cross-linking protein Girdin and its activator Akt further confirm the disruption of actin remodeling caused by DISC1 deficiency. This points to the hypothesis that DISC1 knockdown impairs the actin cytoskeleton in tangentially migrating cortical interneurons, finally resulting in a restricted ability to perform soma translocations, as depicted in Figure 9.

KNOCKDOWN OF DISC1 INTERFERES WITH MICROTUBULE STABILIZATION IN LEADING PROCESS TIPS OF MIGRATING INTERNEURONS

In addition to actin, the microtubule cytoskeleton plays an essential role during brain development. For glia-guided migrating cells it has been shown that microtubule organization is not solely responsible for the polarity, but also participates in migration. The centrosome as the main microtubule organization center is located in front of the nucleus. The correct localization of centrosome-associated proteins ensures its functionality and is necessary for the accurate radial migration of cortical neurons in the neocortex (Higginbotham and Gleeson, 2007). Microtubules spreading out of the centrosome built a cup-like structure surrounding the nucleus (Rivas and Hatten, 1995; Xie et al., 2003; Tsai et al., 2007) and reach into the leading process where they are linked to the cellular cortex (Asada and Sanada, 2010). It has been suggested that the DISC1 binding partner LIS1 activates the dynein motor complex, which is necessary for the coupling of the centrosome and the nucleus. During somal translocation the motor complex moves along microtubule fibers and pulls the nucleus forward. Loss of function of dynein and other components of the motor complex like LIS1 causes uncoupling of the centrosome from the nucleus and impairs neuronal migration and positioning (Shu et al., 2004).

In contrast, several studies found no impact of microtubule dynamics on nucleokinesis during tangential migration of cortical interneurons (He et al., 2010; Martini and Valdeolmillos, 2010). Thus, the microtubule network is necessary basically to build the leading process and to act as a guide for the nucleus. However, also in tangentially migrating interneurons microtubule-dependent pulling forces in addition to actomyosin-dependent pushing forces have also been considered (Bellion et al., 2005). Thus, pulling as well as pushing mechanisms are possible in all migrating neurons whereupon the substrate that has a considerable impact on adhesion, is also crucial for the locomotion of cells (Bellion et al., 2005; He et al., 2010; Martini and Valdeolmillos, 2010; Luccardini et al., 2013). However, a recent study indicates an important role of microtubule dynamics in migrating MGE-derived cells. Prior nucleokinesis the centrosome moves forward along extracentrosomal microtubules into the leading process where it docks to the cellular membrane and exposes a primary cilium at the cell surface. Nuclear translocation occurs along microtubule bundles comprising extracentrosomal microtubules followed by detaching of the centrosome from the cellular membrane suggesting involvement of the microtubule cytoskeleton in nucleokinesis too (Baudoin et al., 2012).

DISC1 has been described previously to associate with microtubular organization and dynamics. Like LIS1 it is a part of the dynein motor complex and accumulates as well as stabilizes other centrosomal proteins at the centrosome and therefore up-regulates its function. Accordingly, overexpression of LIS1 as well as DISC1 leads to microtubule accumulation in the cell periphery and knockdown to a disorganized network in COS-7 cells (Smith et al., 2000; Kamiya et al., 2005). Additionally to its role in dynein-based microtubule-associated transport, DISC1 modulates the transport of organelles and components of the cytoskeleton through its direct interaction with kinesin-1 (Taya et al., 2007; Wang and Brandon, 2011). However, analyzing assembly and integrity of the microtubule cytoskeleton in DISC1 deficient NIH3T3 fibroblasts we could not observe any impact of DISC1 on microtubule organization. Cells with reduced expression levels of DISC1 displayed the same microtubule behavior and EB3 dynamics as control cells indicating no effect on polymerization and depolymerization of microtubule fibers.

In axonal growth cones, branch formation is initiated by actin and then followed by microtubule invasion. Stabilized microtubule bundles extend into the growth cone where they interact with actin arcs and actin filaments. Explorative dynamic microtubule fibers reach into the periphery and respond to guidance cues from the environment. Since complete inhibition of microtubule dynamics prevents turning of the growth cone, localized stabilization induces turning (reviewed in Lowery and Vactor, 2009; Kalil and Dent, 2014). To identify possible effects of a DISC1 knockdown on microtubule-based functions of the growth cone-like structure we analyzed microtubule stabilization in leading processes of MGE cells. Reduced stabilization at the distal ends of the processes indicates an effect on the functionality of the steering apparatus as stabilized microtubule bundles do not reach into the growth cone-like structure. This was also observed in LIS1 deficient interneurons, further confirming the close relationship between these two proteins (Gopal et al., 2010). How this effect on the microtubule cytoskeleton is mediated and whether it also has an impact on the integration of guidance cues has to be examined in future studies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Sawa for providing the mutant DISC1 expression vector, Dr. Anderson for the Lhx6-IRES-GFP vector, Dr. Galjart for the EB3-GFP vector, and Dr. Kessels for the anti- α -Tubulin antibody. We also thank Christine Raue and Elisabeth Meyer for excellent technical assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://www.frontiersin.org/journal/10.3389/fncel.2014.00190/abstract>

REFERENCES

- Asada, N., and Sanada, K. (2010). LKB1-mediated spatial control of GSK3 β and adenomatous polyposis coli contributes to centrosomal forward movement and neuronal migration in the developing neocortex. *J. Neurosci.* 30, 8852–8865. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6140-09.2010
- Ayhan, Y., Abazyan, B., Nomura, J., Kim, R., Ladenheim, B., Krasnova, I. N., et al. (2011). Differential effects of prenatal and postnatal expressions of mutant

- human DISC1 on neurobehavioral phenotypes in transgenic mice: evidence for neurodevelopmental origin of major psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry* 16, 293–306. doi: 10.1038/mp.2009.144
- Bai, J., Ramos, R. L., Paramasivam, M., Siddiqi, F., Ackman, J. E., and LoTurco, J. J. (2008). The role of DCX and LIS1 in migration through the lateral cortical stream of developing forebrain. *Dev. Neurosci.* 30, 144–156. doi: 10.1159/000109859
- Bando, J. P., Viou, L., Launay, P. S., Luccardini, C., Espeso Gil, S., Kiyasova, V., et al. (2012). Tangentially migrating neurons assemble a primary cilium that promotes their reorientation to the cortical plate. *Neuron* 76, 1108–1122. doi: 10.1016/j.neuron.2012.10.027
- Bellion, A., Bando, J. P., Alvarez, C., Bornens, M., and Metin, C. (2005). Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J. Neurosci.* 25, 5691–5699. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1030-05.2005
- Borrell, V., Yoshimura, Y., and Callaway, E. M. (2005). Targeted gene delivery to telencephalic inhibitory neurons by directional *in utero* electroporation. *J. Neurosci. Methods* 143, 151–158. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.09.027
- Bortone, D., and Pollux, F. (2009). KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron* 62, 53–71. doi: 10.1016/j.neuron.2009.01.034
- Brandon, N. J., Millar, J. K., Korth, C., Sive, H., Singh, K. K., and Sawa, A. (2009). Understanding the role of DISC1 in psychiatric disease and during normal development. *J. Neurosci.* 29, 12768–12775. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3355-09.2009
- Brown, K. N., Chen, S., Han, Z., Lu, C. H., Tan, X., Zhang, X. J., et al. (2011). Clonal production and organization of inhibitory interneurons in the neocortex. *Science* 334, 480–486. doi: 10.1126/science.1208884
- Camargo, L. M., Collura, V., Rain, J. C., Mizuguchi, K., Hermjakob, H., Kerrien, S., et al. (2007). Disrupted in schizophrenia 1 interactome: evidence for the close connectivity of risk genes and a potential synaptic basis for schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 12, 74–86. doi: 10.1038/sj.mp.4001880
- Cannon, M., Caspi, A., Moffitt, T. E., Harrington, H., Taylor, A., Murray, R. M., et al. (2002). Evidence for early-childhood, pan-developmental impairment specific to schizophreniform disorder: results from a longitudinal birth cohort. *Arch. Gen. Psychiatry* 59, 449–456. doi: 10.1001/archpsyc.59.5.449
- Cash-Padgett, T., and Jaaro-Peled, H. (2013). DISC1 mouse models as a tool to decipher gene-environment interactions in psychiatric disorders. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 113. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00113
- Duan, X., Chang, J. H., Ge, S., Faulkner, R. L., Kim, J. Y., Kitabatake, Y., et al. (2007). Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell* 130, 1146–1158. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.010
- Enomoto, A., Asai, N., Namba, T., Wang, Y., Kato, T., Tanaka, M., et al. (2009). Roles of disrupted-in-schizophrenia 1-interacting protein girdin in postnatal development of the dentate gyrus. *Neuron* 63, 774–787. doi: 10.1016/j.neuron.2009.08.015
- Enomoto, A., Murakami, H., Asai, N., Morone, N., Watanabe, T., Kawai, K., et al. (2005). Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev. Cell* 9, 389–402. doi: 10.1016/j.devcel.2005.08.001
- Enomoto, A., Ping, J., and Takahashi, M. (2006). Girdin, a novel actin-binding protein, and its family of proteins possess versatile functions in the Akt and Wnt signaling pathways. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1086, 169–184. doi: 10.1196/annals.1377.016
- Gopal, P. P., Simonet, J. C., Shapiro, W., and Golden, J. A. (2010). Leading process branch instability in *Lis1*^{+/−} nonradially migrating interneurons. *Cereb. Cortex* 20, 1497–1505. doi: 10.1093/cercor/bhp211
- He, M., Zhang, Z. H., Guan, C. B., Xia, D., and Yuan, X. B. (2010). Leading tip drives soma translocation via forward F-actin flow during neuronal migration. *J. Neurosci.* 30, 10885–10898. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0240-10.2010
- Higginbotham, H. R., and Gleeson, J. G. (2007). The centrosome in neuronal development. *Trends Neurosci.* 30, 276–283. doi: 10.1016/j.tins.2007.04.001
- Ishizuka, K., Paek, M., Kamiya, A., and Sawa, A. (2006). A review of Disrupted-In-Schizophrenia-1 (DISC1): neurodevelopment, cognition, and mental conditions. *Biol. Psychiatry* 59, 1189–1197. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.03.065
- Kali, K., and Dent, E. W. (2014). Branch management: mechanisms of axon branching in the developing vertebrate CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 7–18. doi: 10.1038/nrn3650
- Kamiya, A., Kubo, K., Tomoda, T., Takaki, M., Youn, R., Ozeki, Y., et al. (2005). A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat. Cell Biol.* 7, 1167–1178. doi: 10.1038/ncb1328
- Kato, M., and Dobyns, W. E. (2003). Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration. *Hum. Mol. Genet.* 12 Spec. No 1, R89–R96. doi: 10.1093/hmg/ddg086
- Kholmanskikh, S. S., Dobrin, I. S., Wynshaw-Boris, A., Letourneau, P. C., and Ross, M. E. (2003). Disregulated RhoGTPases and actin cytoskeleton contribute to the migration defect in *Lis1*-deficient neurons. *J. Neurosci.* 23, 8673–8681.
- Kim, J. Y., Duan, X., Liu, C. Y., Jang, M. H., Guo, J. U., Pow-angponkul, N., et al. (2009). DISC1 regulates new neuron development in the adult brain via modulation of AKT-mTOR signaling through KIAA1212. *Neuron* 63, 761–773. doi: 10.1016/j.neuron.2009.08.008
- Kubo, K., Tomita, K., Uto, A., Kuroda, K., Seshadri, S., Cohen, J., et al. (2010). Migration defects by DISC1 knockdown in C57BL/6, 129X1/SvJ, and ICR strains via *in utero* gene transfer and virus-mediated RNAi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400, 631–637. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.08.117
- Lee, C. W., Vitriol, E. A., Shim, S., Wise, A. L., Velayutham, R. P., and Zheng, J. Q. (2013). Dynamic localization of G-actin during membrane protrusion in neuronal motility. *Curr. Biol.* 23, 1046–1056. doi: 10.1016/j.cub.2013.04.057
- Lowery, L. A., and Van Vactor, D. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 332–343. doi: 10.1038/nrm2679
- Luccardini, C., Hennekinne, L., Viou, L., Yanagida, M., Murakami, F., Kessaris, N., et al. (2013). N-cadherin sustains motility and polarity of future cortical interneurons during tangential migration. *J. Neurosci.* 33, 18149–18160. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0593-13.2013
- Marin, O., and Rubenstein, J. L. (2001). A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 780–790. doi: 10.1038/35097509
- Marin, O., and Rubenstein, J. L. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 441–483. doi: 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131058
- Martini, F. J., and Valdeolmillos, M. (2010). Actomyosin contraction at the cell rear drives nuclear translocation in migrating cortical interneurons. *J. Neurosci.* 30, 8660–8670. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1962-10.2010
- McManus, M. E., Nasrallah, I. M., Pancoast, M. M., Wynshaw-Boris, A., and Golden, J. A. (2004). *Lis1* is necessary for normal non-radial migration of inhibitory interneurons. *Am. J. Pathol.* 165, 775–784. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63340-8
- Metin, C., Bando, J. P., Rakic, S., and Parnavelas, J. G. (2006). Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. *Eur. J. Neurosci.* 23, 894–900. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04630.x
- Meyer, K. D., and Morris, J. A. (2009). Disc1 regulates granule cell migration in the developing hippocampus. *Hum. Mol. Genet.* 18, 3286–3297. doi: 10.1093/hmg/ddp266
- Millar, J. K., Christie, S., Semple, C. A., and Porteous, D. J. (2000). Chromosomal location and genomic structure of the human translin-associated factor X gene (TRAX; TSNAX) revealed by intergenic splicing to DISC1, a gene disrupted by a translocation segregating with schizophrenia. *Genomics* 67, 69–77. doi: 10.1006/geno.2000.6239
- Murray, R. M., and Lewis, S. W. (1987). Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder? *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* 295, 681–682.
- Nadarajah, B., and Parnavelas, J. G. (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 423–432. doi: 10.1038/nrn845
- Narayan, S., Nakajima, K., and Sawa, A. (2013). DISC1: a key lead in studying cortical development and associated brain disorders. *Neuroscientist* 19, 451–464. doi: 10.1177/1073858412470168
- Nasrallah, I. M., McManus, M. E., Pancoast, M. M., Wynshaw-Boris, A., and Golden, J. A. (2006). Analysis of non-radial interneuron migration dynamics and its disruption in *Lis1*^{+/−} mice. *J. Comp. Neurol.* 496, 847–858. doi: 10.1002/cne.20966
- Owen, M. J., O'Donovan, M. C., Thapar, A., and Craddock, N. (2011). Neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Br. J. Psychiatry* 198, 173–175. doi: 10.1192/bjp.bp.110.684384
- Pletnikov, M. V., Ayhan, Y., Nikolskaia, O., Xu, Y., Ovanesov, M. V., Huang, H., et al. (2008). Inducible expression of mutant human DISC1 in mice is associated with brain and behavioral abnormalities reminiscent of schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 13, 173–186. doi: 10.1038/sj.mp.4002079

- Rakic, P. (1971). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J. Comp. Neurol.* 141, 283–312.
- Rivas, R. I., and Hatten, M. E. (1995). Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* 15, 981–989.
- Schulze, E., Asai, D. J., Bulinski, J. C., and Kirschner, M. (1987). Posttranslational modification and microtubule stability. *J. Cell Biol.* 105, 2167–2177. doi: 10.1083/jcb.105.5.2167
- Shinohara, R., Thumke, D., Kamijo, H., Kaneko, N., Sawamoto, K., Watanabe, K., et al. (2012). A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in tangential migration of interneuron precursors. *Nat. Neurosci.* 15, 373–380, S1–S2. doi: 10.1038/nn.3020
- Shu, T., Ayala, R., Nguyen, M. D., Xie, Z., Gleeson, J. G., and Tsai, L. H. (2004). Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. *Neuron* 44, 263–277. doi: 10.1016/j.neuron.2004.09.030
- Smith, D. S., Niethammer, M., Ayala, R., Zhou, Y., Gambello, M. J., Wynshaw-Boris, A., et al. (2000). Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1. *Nat. Cell Biol.* 2, 767–775. doi: 10.1038/35041000
- Soares, D. C., Carlyle, B. C., Bradshaw, N. J., and Porteous, D. I. (2011). DISC1: structure, function, and therapeutic potential for major mental illness. *ACS Chem. Neurosci.* 2, 609–632. doi: 10.1021/cn200062k
- Steinecke, A., Gampe, C., Valkova, C., Kaether, C., and Bolz, J. (2012). Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) is necessary for the correct migration of cortical interneurons. *J. Neurosci.* 32, 738–745. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5036-11.2012
- Stepanova, T., Slemmer, J., Hoogenraad, C. C., Lansbergen, G., Dortland, B., De Zeeuw, C. I., et al. (2003). Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein). *J. Neurosci.* 23, 2655–2664.
- Taya, S., Shinoda, T., Tsuboi, D., Asaki, J., Nagai, K., Hikita, T., et al. (2007). DISC1 regulates the transport of the NUDEL/LIS1/14-3-3 epsilon complex through Kinesin-1. *J. Neurosci.* 27, 15–26. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3826-06.2006
- Thomson, P. A., Malavasi, E. L., Grunewald, E., Soares, D. C., Borkowska, M., and Millar, J. K. (2013). DISC1 genetics, biology and psychiatric illness. *Front. Biol. (Beijing)* 8, 1–31. doi: 10.1007/s11515-012-1254-7
- Tomita, K., Kubo, K., Ishii, K., and Nakajima, K. (2011). Disrupted-in-Schizophrenia-1 (Disc1) is necessary for migration of the pyramidal neurons during mouse hippocampal development. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2834–2845. doi: 10.1093/hmg/ddr194
- Tsai, J. W., Bremner, K. H., and Vallee, R. B. (2007). Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue. *Nat. Neurosci.* 10, 970–979. doi: 10.1038/nn1934
- Valiente, M., and Martini, F. J. (2009). Migration of cortical interneurons relies on branched leading process dynamics. *Cell Adh. Migr.* 3, 278–280. doi: 10.4161/cam.3.3.8832
- Wang, Q., and Brandon, N. J. (2011). Regulation of the cytoskeleton by Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1). *Mol. Cell. Neurosci.* 48, 359–364. doi: 10.1016/j.mcn.2011.06.004
- Wang, Y., Kaneko, N., Asai, N., Enomoto, A., Isotani-Sakakibara, M., Kato, T., et al. (2011). Girdin is an intrinsic regulator of neuroblast chain migration in the rostral migratory stream of the postnatal brain. *J. Neurosci.* 31, 8109–8122. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1130-11.2011
- Weinberger, D. R. (1987). Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 44, 660–669. doi: 10.1001/arch-psyc.1987.01800190080012
- Westermann, S., and Weber, K. (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 938–947. doi: 10.1038/nrm1260
- Xie, Z., Sanada, K., Samuels, B. A., Shih, H., and Tsai, L. H. (2003). Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration. *Cell* 114, 469–482. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00605-6
- Young-Pearse, T. L., Snth, S., Lnth, E. S., Sawa, A., and Selkoe, D. J. (2010). Biochemical and functional interaction of disrupted-in-schizophrenia 1 and amyloid precursor protein regulates neuronal migration during mammalian cortical development. *J. Neurosci.* 30, 10431–10440. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1445-10.2010
- Yozu, M., Tabata, H., and Nakajima, K. (2005). The caudal migratory stream: a novel migratory stream of interneurons derived from the caudal ganglionic eminence in the developing mouse forebrain. *J. Neurosci.* 25, 7268–7277. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2072-05.2005

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 23 May 2014; accepted: 20 June 2014; published online: 08 July 2014.

Citation: Steinecke A, Gampe C, Nitzsche F and Bolz J (2014) DISC1 knock-down impairs the tangential migration of cortical interneurons by affecting the actin cytoskeleton. *Front. Cell. Neurosci.* 8:190. doi: 10.3389/fncel.2014.00190

This article was submitted to the journal *Frontiers in Cellular Neuroscience*.

Copyright © 2014 Steinecke, Gampe, Nitzsche and Bolz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.